

aus dem Max-Planck-Institut
für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim
Abt. für Molekulare Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Thomas Braun

Gentherapeutische Modelle zur anti-angiogenen Therapie experimenteller Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Anke Nicolaus

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 09.09.2005.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Matthias Clauss

1. Co-Referent: Prof. Dr. Rolf Müller

2. Co-Referent: Prof. Dr. Joachim Hoyer

für Papa

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Gefäßentwicklung im Embryo	1
I.2 Signalübertragung durch endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	3
I.2.1 VEGF/VEGFR-System	4
I.2.2 VEGF und Neuropiline	8
I.2.3 Angiopoietine und Tie-Rezeptoren	9
I.3 Die transkriptionelle Kontrolle der Gefäßentwicklung	11
I.4 Tumorangiogenese	15
I.5 Anti-angiogene Strategien der Tumorthherapie	18
I.6 Avidin-Biotin-Technologie	20
I.7 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin	22
I.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	25
 II. Material und Methoden	 26
II.1 Geräte	26
II.2 Verbrauchsmaterialien	27
II.2.1 Chemikalien und Enzyme	27
II.2.2 Verwendete Antikörper	28
II.2.3 Sonstiges	29
II.3 Häufig verwendete Lösungen	29
II.4 Verwendete Plasmide	30
II.5 Verwendete Oligonukleotide	31
II.6 Bakterien	32
II.6.1 Verwendete Bakterien	32
II.6.2 Bakterienmedien	32
II.6.3 Lagerung und Vermehrung	33
II.6.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	33
II.6.5 Chemische Transformation von Bakterien	34
II.7 DNA	34
II.7.1 Isolation von DNA	34
II.7.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	34
II.7.1.2 Isolation genomischer DNA aus Gewebe	35

II.12 Immunhistologie von Gewebeschnitten	50
II.12.1 Herstellung von Gefrierschnitten	50
II.12.2 Immunhistochemische Färbung	50
II.12.3 Indirekte Doppel-Immunfluoreszenzfärbung	51
II.12.4 Herstellung von Mowiol-Lösung	52
II.13 Gewebekultur	53
II.13.1 Standardlösungen und -medien für die Gewebekultur	53
II.13.2 Verwendete Zelllinien	54
II.13.3 Verwendete Medien	54
II.13.4 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen	55
II.13.5 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	55
II.13.6 Gelatinisierung von Zellkulturschalen	55
II.13.7 Bestimmung der Zellzahl	56
II.13.8 Transfektionen und Infektionen eukaryotischer Zellen	56
II.13.8.1 Transiente und stabile Transfektion mittels Liposomen	56
II.13.8.2 Stabile Transfektion von GP+E86 Zellen zur Generierung von Retroviren	57
II.13.8.3 Infektion von Nagerzellen mittels Retroviren	58
II.13.9 Titerbestimmung von virusproduzierenden GP+E86 Zellen	59
II.13.10 Immunfluoreszenz transienter und stabil transfizierter Zellen	59
II.13.11 <i>In vitro</i> Bindungsstudien	60
II.13.12 <i>In vitro</i> Proliferationstest	60
II.13.13 Luziferase-Reportergen-Analyse	61
II.13.14 Tetrazyklin-basierende Systeme zur regulierten Genexpression	61
III. Ergebnisse	64
III.1 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin	64
III.1.1 Endothelzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin	64
III.1.1.1 Endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine im transgenen Tier	64
III.1.1.2 Endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine im Wildtyp Tier	77
III.1.2 Tumorzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin im Wildtyp Tier	82
III.1.3 <i>In vivo</i> Bindungsstudien systemisch applizierter Liganden	87

III.2 Einfluss dominant-negativer Transkriptionsfaktoren auf die Tumorangienese	91
III.2.1 Dominant-negatives Ets-1	91
III.2.2 Dominant-negatives HIF2 α	101
IV. Diskussion	105
IV.1 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin für die Therapie und Diagnostik von Tumoren	105
IV.2 Einfluss dominant-negativer Transkriptionsfaktoren auf die Tumorangienese	123
V. Zusammenfassung	135
VI. Literaturverzeichnis	137
VII. Anhang	162
VII.1 Abkürzungsverzeichnis	162
VII.2 Akademische Lehrer	166
VII.3 Erklärung	167

I. Einleitung

I.1 Gefäßentwicklung im Embryo

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktional entwickelte Organ in Vertebraten, das die Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff, Nährstoffen und Botenstoffen sowie den Abtransport von Abbauprodukten des Stoffwechsels gewährleistet. Dabei wird die Bildung des Blutgefäßsystems durch den koordinierten Ablauf von Vaskulogenese und Angiogenese erreicht (Pardanaud et al., 1989; Risau und Flamme, 1995). Im adulten Organismus kommt Gefäßneubildung nur selten vor, wie z.B. während der Aufbauphase des Endometriums oder kurzzeitig bei der Wundheilung. Dieser Prozess läuft unter streng kontrollierten Bedingungen pro- und anti-angiogener Faktoren ab, die im Gleichgewicht vorliegen (siehe auch Tab. I.1). Anders verhält es sich in Tumoren. Ab einer gewissen Größe des Zellklons ist der Tumor auf die Neubildung eines eigenen Gefäßsystems angewiesen und induziert die Vaskularisierung, indem er das Gleichgewicht in Richtung Angiogenese verschiebt (Hanahan und Folkman, 1996). Somit sind Wachstum, Progression und Metastasierung eines Tumors angiogeneseabhängig. Studien an Embryonen zum Ablauf zellulärer und molekularer Mechanismen bei der physiologischen Gefäßentwicklung können hilfreich sein, um Mechanismen der pathophysiologischen Neovaskularisierung maligner Tumoren zu verstehen und sie gegebenenfalls für therapeutische Anwendungen zu nutzen.

Die *de novo*-Ausbildung eines primitiven Gefäßsystems während der Embryonalentwicklung wird als **Vaskulogenese** bezeichnet (Risau und Flamme, 1995). Sie beginnt mit der Differenzierung vaskulärer Vorläuferzellen im primitiven embryonalen Mesoderm und ist abhängig von Signalen des Fibroblastenwachstumsfaktors (FGF) (Risau und Flamme, 1995; Risau, 1997). Dies führt in einer Subpopulation mesodermaler Zellen zur Expression des Rezeptors für den Gefäßendothelzellwachstumsfaktor (VEGF Rezeptor-2, Flk-1) (Eichmann et al., 2002; Kubo und Alitalo, 2003). Über Migrationsprozesse gelangen diese Vorläuferzellen zum extraembryonalen Dottersack und bilden erste vaskuläre Strukturen aus, die als Blutinseln bezeichnet werden. Im Zentrum dieser Zellaggregate differenzieren hämatopoetische Vorläuferzellen, während die Zellen der Peripherie die Vorläufer der Endothelzellen sind und als *Angioblasten* bezeichnet werden (Risau und Flamme, 1995). Aufgrund der zeitgleichen Entwicklung von hämatopoetischen und endothelialen Zellen sowie der engen räumlichen Assoziation der entsprechenden Vorläuferzellen wurde ein gemeinsamer Vorläufer beider Linien, der *Hämangioblast*, postuliert (Risau und Flamme,

1995). Auch die Differenzierung glatter Muskelzellen aus Flk-1 positiven Progenitorzellen wurde beobachtet und führte zu der Annahme, dass alle drei Zelltypen aus einem gemeinsamen Vorläufer entstehen könnten (Yamashita et al., 2000). Im Verlauf der Entwicklung fusionieren die entstandenen Blutinseln schließlich zu einem kontinuierlichen primitiven Gefäßnetz, das noch über keine hierarchische Gliederung in Arterien und Venen verfügt.

Kurz nach Differenzierung der extraembryonalen Angioblasten im Dottersack entstehen im lateralen Mesoderm intraembryonale Endothelzellvorläufer in engem Kontakt mit dem Endoderm (Pardanaud et al., 1987). Anders als bei der extraembryonalen Entwicklung der Endothelzellen erfolgt die Differenzierung intraembryonaler Angioblasten nicht in Assoziation mit hämatopoetischen Vorläuferzellen (Pardanaud et al., 1996). Einzige Ausnahme ist der splanchnopleurale Anteil des lateralen Mesoderms. In diesem differenzieren Vorläuferzellen, aus denen sich neben Angioblasten der viszerale Organe auch hämatopoetische Vorläuferzellen der ventralen Aorta ableiten (Cormier et al., 1986; Olah et al., 1988). Die intraembryonalen Angioblasten fusionieren schließlich *in situ* zu Blutgefäßen oder sie migrieren einzeln oder als Zellaggregate und integrieren in schon bestehende Gefäße. Anschließend verbinden sich extra- und intraembryonale Gefäßanlagen zu einem gemeinsamen primitiven Gefäßsystem. Die Vaskulogenese als Form der Gefäßbildung durch Fusion von Angioblasten tritt hauptsächlich während der Embryonalentwicklung auf. Allerdings wurden auch im adulten Organismus zirkulierende Endothelzellvorläufer (EPC) beobachtet. Sie verfügen wie Angioblasten und hämatopoetische Vorläuferzellen über dieselben Zellmarker wie Flk-1 oder CD34 (zusammengefasst bei Luttun et al., 2002). EPC integrieren an Orten der Neovaskularisierung wie im ischämischen Gewebe oder in Tumoren und differenzieren zu reifen Endothelzellen (Asahara et al., 1997; 1999a; 1999b; Luttun et al., 2002).

Die weitere Gefäßentwicklung im Embryo verläuft durch den Prozess der **Angiogenese** und führt zur Verfeinerung und Remodellierung der primitiven vaskulären Strukturen. Hierbei unterscheidet man zwischen *Sprossung* und *Intussuszeption*. Voraussetzung für die sprossende Angiogenese ist die proteolytische Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (ECM), die es den Endothelzellen ermöglicht, in das perivaskuläre Gewebe auszuwandern. Hierzu setzen aktivierte Endothelzellen sowohl verschiedene Proteasen als auch deren Inhibitoren frei, die die Degradation lokal begrenzen. (Mignatti und Rifkin, 1996; Pepper et al., 1991). Anschließend erfolgt die Migration und Proliferation der Endothelzellen und somit die Ausbildung neuer

Blutgefäße und kapillarer Schleifen. *Intussuszeption* hingegen bezeichnet die Teilung bereits existierender Gefäße. Dabei wird durch die Proliferation von Endothelzellen innerhalb eines Gefäßes zunächst das Lumen vergrößert und anschließend durch die Ausbildung transkapillarer Septen unterteilt (Burri und Tarek, 1990; Patan et al., 1992; 1996a). Mit der Remodellierung setzt auch die Reifung der Gefäße ein, die zur hierarchischen Gliederung des Gefäßsystems in Arterien, Venen und Kapillaren führt. Durch Rekrutierung mesenchymaler periendothelialer Zellen, die zu Perizyten, glatten Muskelzellen und Fibrozyten differenzieren, kommt es zur Ausbildung einer stabilisierenden Gefäßwand. Grundlegend besteht diese aus drei Schichten, der *Tunica intima*, der intermediären *Tunica media* sowie der äußeren *Tunica externa*, auch *Adventitia* genannt. Bei größeren Blutgefäßen reicht die Versorgung der äußeren Schichten durch Diffusion aus dem Blutstrom nicht aus, so dass zusätzlich kleinere Blutgefäße der Adventitia, so genannte *Vasa vasorum*, den Stoffwechsel gewährleisten.

I.2 Signalübertragung durch endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Maßgeblich an der Entwicklung des Blutgefäßsystems beteiligt sind die Familie der Wachstumsfaktoren für vaskuläre Endothelzellen (VEGF) und deren Rezeptoren (VEGFR) sowie das Angiopoietin/Angiopoietin-Rezeptorsystem (Abb. I.1). Hierbei umfasst die Gruppe der Wachstumsfaktoren die 5 sekretorischen Glykoproteine VEGF, auch als VEGF-A oder vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D sowie der Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF). Alle Mitglieder dieser Familie verfügen über eine konservierte Domäne aus acht Cysteinresten und üben ihre Funktion als antiparallele Dimere aus. Zu den Mitgliedern der VEGF-Rezeptor-Familie gehören die drei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) sowie VEGFR-3 (Flt-4). Sie gehören der Klasse III der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) an und weisen extrazellulär sieben Immunglobulindomänen zur Ligandenbindung und intrazellulär eine geteilte Tyrosin-Kinase Domäne auf (Galland et al., 1993; Joukov et al., 1996; Mustonen und Alitalo, 1995). Ebenso binden VEGFs an die Rezeptoren Neuropilin-1 und -2 (NRP-1 und NRP-2), die zur kleinen Familie der Typ I Transmembranproteine gehören sowie an heparansulfathaltige Proteoglykane der Zelloberfläche (Veikkola et al., 2000; Yancopoulos et al., 2000). Die Rezeptoren der Angiopoietine, Tie-1 und Tie-2, verfügen über einen komplexen extrazellulären Anteil. Dieser besteht aus einer kompletten und einer inkompletten Immunglobulin-ähnlichen Domäne, die von drei EGF- sowie drei Fibronektin-ähnlichen Domänen getrennt werden

(zusammengefasst bei Jones et al., 2001). Die Angiopoietin-Familie wird von den vier Mitgliedern Ang-1, Ang-2, Ang-3 und Ang-4 gebildet. Mit Ausnahme von Ang-1 binden diese als Homodimere an Tie-2. Ang-1 bindet als Homotetramer (Procopio et al., 1999). Liganden für Tie-1 sind derzeit noch nicht bekannt.

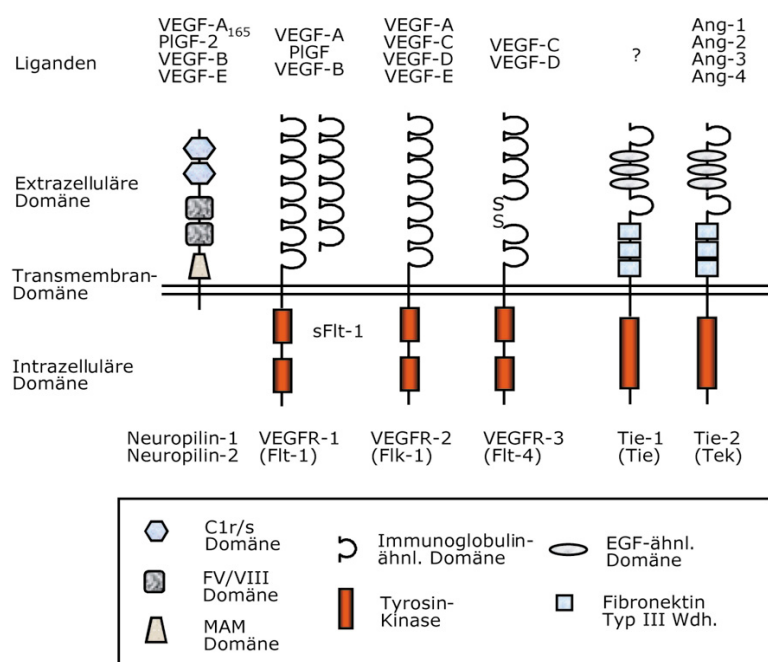


Abb. I.1 Schematische Darstellung endothelialer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

(Die Abbildung wurde von G. Breier zur Verfügung gestellt)

I.2.1 VEGF/VEGFR-System

Als erstes Mitglied der VEGF-Familie mit potenter mitogener Aktivität auf Endothelzellen wurde der Wachstumsfaktor VEGF-A beschrieben (Ferrara und Henzel, 1989), der identisch mit dem bereits zuvor charakterisierten vaskulären Permeabilitätsfaktor (VPF) ist (Connolly et al., 1989; Senger et al., 1983). Seine Expression ist räumlich und zeitlich mit annähernd allen Prozessen der physiologischen und pathophysiologischen Gefäßneubildung assoziiert (zusammengefasst bei Ferrara et al., 2003). Durch alternatives Spleißen werden Isoformen von 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren exprimiert, wobei letztere ausschließlich im humanen Organismus detektiert wurde. Die Affinität der Isoformen zur Bindung an die ECM korreliert mit dem Vorhandensein der Heparin-bindenden Domäne. So sequestriert VEGF-A₁₈₉ an

heparansulfathaltigen Proteoglykanen der Zelloberfläche, während VEGF-A₁₂₁ frei diffundieren kann.

VEGF-A stimuliert die Proliferation von Endothelzellen (Keck et al., 1989; Leung et al., 1989) und fungiert durch Reduktion der Apoptoserate als endothelialer Überlebensfaktor neu gebildeter Blutgefäße (Alon et al., 1995; Benjamin und Keshet, 1997; Gerber et al., 1999). Auch die Migration von Endothelzellen wird durch VEGF stimuliert (Waltenberger et al., 1994), wobei z.B. die Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und Plasminogen-Aktivatoren vom Urokinase-Typ (U-PA) (Mignatti und Rifkin, 1996) sowie des PA-Inhibitors PAI-1 (Pepper et al., 1991) erhöht wird. Ebenfalls moduliert VEGF-A die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das als endothelialer Rezeptor für Bestandteile der extrazellulären Matrix die für die Migration nötige Interaktion zwischen Endothelzellen und der ECM vermittelt (Friedlander et al., 1995; Varner et al., 1995).

Die VEGF-Signalübertragung in Endothelzellen erfolgt vor allem über den **VEGF Rezeptor-2 (Flk-1)** (Millauer et al., 1993; 1994), einem der frühesten Marker für die Gefäßentwicklung (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993). Flk-1-defiziente Mäuse starben *in utero* an Tag 9 der Embryonalentwicklung und wiesen eine fehlende Ausbildung sowohl von Endothelzellen als auch von Blutzellen auf. Blutinseln im Dottersack wurden nicht ausgebildet. Organisierte Gefäßstrukturen und hämatopoetische Vorläuferzellen in Embryo und Dottersack waren nicht zu erkennen, was die Rolle des Flk-1 in der Differenzierung vaskulärer Vorläuferzellen bestätigte (Shalaby et al., 1995). Auch die VEGF-A Geninaktivierung führte zur embryonalen Letalität an Tag 9 der Entwicklung. Bereits der Verlust eines VEGF-A Allels resultierte in einer reduzierten Ausbildung von Gefäßen. Während die Differenzierung von Angioblasten nicht beeinflusst war, bildete sich im Dottersack nur ein primitiver Gefäßplexus aus und war die intraembryonale Gefäßbildung gestört (Carmeliet et al., 1996; 1999b; Ferrara et al., 1996). Der vaskuläre Phänotyp nach homozygoter VEGF-A Geninaktivierung war noch stärker ausgeprägt und glich dem von Flk-1^{-/-} Mäusen (Carmeliet et al., 1999b). Diese Ergebnisse weisen auf eine dosisabhängige Wirkung der embryonalen Gefäßentwicklung von VEGF-A hin. Weitere Studien demonstrierten die Abhängigkeit des Gefäßsystems von VEGF-Signalen auch in späteren Entwicklungsstadien. So führte die zellspezifische Inaktivierung des VEGF-A Gens in Neuronen und Astrozyten zu einer verminderten Vaskularisierung im Gehirn und neuronaler Apoptose in neonatalen Mäusen (Raab et al., 2004).

Anders als andere Mitglieder der VEGF-Familie verfügen VEGF-C und VEGF-D über amino- und carboxyterminale Regionen, die während der Sekretion proteolytisch gespalten werden. Beide vollständig prozessierten Liganden binden schließlich an Flk-1. Über diesen Rezeptor wirken sie mitogen auf Endothelzellen und permeabilitätssteigernd auf Gefäße (Jussila und Alitalo, 2002). Auch der VEGF-C vermittelte Einfluss auf die Differenzierung früher Flk-1 positiver Endothelzellvorläufer (Eichmann et al., 1998) sowie auf die proteolytische Aktivität von Endothelzellen (Pepper et al., 1998) deuten auf eine Redundanz von VEGF-C mit VEGF-A hin. Mit Ausnahme der Lunge wird VEGF-D während der embryonalen Entwicklung nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Diese vornehmlich organspezifische Expression ist auch im adulten Organismus zu beobachten (Farnebo et al., 1999).

Die Bindung der Liganden führt zur Dimerisierung von Flk-1 und anschließenden Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne. Die phosphorylierten Tyrosinresten interagieren mit Adaptermolekülen oder Phosphatasen (Kroll und Waltenberger, 1997) und initiieren eine Vielzahl von Signalwegen (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). So führt beispielsweise die Aktivierung des p42/44 MAP-Kinase Weges zur transkriptionellen Regulation von Genen, die die Proliferation steuern. Über die Phosphatidylinositol-3'-OH Kinase (PI3 Kinase) und den Akt-Signalweg werden Proteine aus dem Apoptoseprogramm reguliert, die das Überleben der Endothelzellen fördern. Auch führt dieser Signalweg zur Aktivierung der endothelialen Nitroxidsynthase (eNOS), die in Zusammenhang mit der Permeabilität von Gefäßen und der Migration von Endothelzellen gebracht wurde. Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) resultiert in der Reorganisation des Zytoskeletts und hat eine wichtige Funktion bei Migrationsprozessen und der Regulation der Permeabilität (Cross et al., 2003; Issbrucker et al., 2003; Matsumoto et al., 2002).

Modulierend auf die Signaltransduktion des VEGF-Rezeptor-2 wirken zudem funktionale Interaktionen mit anderen endothelialen Molekülen. So führte die Aktivierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zu einer erhöhten Kinaseaktivität von Flk-1 (Soldi et al., 1999) und es wurde eine direkte Interaktion der extrazellulären Domäne von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit Flk-1 bestätigt (Borges et al., 2000). Durch Bindung von VEGF-A an NRP-1 konnte ein positiver Einfluss auf die Flk-1 Rezeptoraktivität nachgewiesen werden, die auf Ausbildung eines ternären Komplexes basierte. Chemotaxis und Mitogenität waren gesteigert (Neufeld et al., 2002; Soker et al., 1998). Ebenso wurde die Co-Expression von Flk-1 mit VE-

Cadherin bestätigt, einem transmembranen Adhäsionsmolekül der Zonula adhärens, das die Interaktionen zwischen benachbarten Endothelzellen reguliert (Breier et al., 1996). Eine VEGF-A induzierte Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin und dessen Bindungspartnern β -Catenin, Plakoglobin und p120 konnte beobachtet werden (Esser et al., 1998). Umgekehrt hatte VE-Cadherin einen negativen Einfluss auf die Aktivierung von Flk-1 (Caveda et al., 1996; Rahimi und Kazlauskas, 1999).

Die Rolle des **VEGF Rezeptor-1 (Flt-1)** in der endothelialen Signalübertragung ist noch weitgehend unklar. Flt-1 bindet VEGF-A mit einer etwa 10-fach stärkeren Affinität als Flk-1. Es wurde jedoch nur eine schwache Autophosphorylierung nach Ligandenbindung beobachtet, die für eine mitogene Antwort nicht ausreichte (Waltenberger et al., 1994). Zusätzlich wird durch alternatives Spleißen eine sekretorische Isoform exprimiert (sFlt-1), die über sechs Immunglobulindomänen zur Ligandenbindung verfügt, aber keine nachweisbare signaltransduzierenden Eigenschaften aufweist (Petrova et al., 1999). Die Inaktivierung des *flt-1* Gens resultierte in früher embryonaler Letalität. Massive Disorganisationen und Vergrößerungen vaskulärer Strukturen konnten beobachtet werden (Fong et al., 1995) und gingen mit einer gesteigerten Differenzierung von Vorläuferzellen zu Endothelzellen einher (Fong et al., 1999). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Flt-1 ein negativer Regulator des VEGF-A Signalweges sein könnte, in dem er VEGF-A sequestriert. Zudem wurde ein negativer Effekt auf den Flk-1 Signalweg bestätigt, indem PI3 Kinase-abhängige Flt-1 Signale antagonistisch zu mitogenen Signalen des VEGF Rezeptors-2 wirkten (Rahimi et al., 2000; Zeng et al., 2001).

Neben VEGF-A binden die vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF-B und PlGF exklusiv an Flt-1. VEGF-B wird vornehmlich im Herz exprimiert (Aase et al., 1999). Es sind zwei Isoformen von 167 und 186 Aminosäuren bekannt (Olofsson et al., 1996). Studien an „knock-out“ Mäusen demonstrierten eine modulierende Rolle von VEGF-B bei der koronaren Angiogenese, die jedoch für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems nicht essentiell ist (Aase et al., 2001; Bellomo et al., 2000). *In vitro* wurde eine gesteigerte Expression und Aktivität von uPA und PAI-1 durch VEGF-B gezeigt, was für eine Funktion dieses Wachstumsfaktors bei der Degradation der ECM, Adhäsion oder Migration spricht (Olofsson et al., 1998). PlGF wird in endothelialen und nicht-endothelialen Zellen der Plazenta exprimiert. PlGF-defiziente Mäuse wiesen jedoch keinen vaskulären Phänotyp während der Embryogenese auf. Im adulten Organismus zeigten diese Tiere jedoch eine massive Störung der Neovaskularisierung von

Tumorgewebe (Carmeliet et al., 2001), was für eine Rolle des Flt-1/PlGF Systems bei der pathophysiologischen Angiogenese spricht.

Um den Tag E8,5 der Embryonalentwicklung wird auch **VEGFR-3 (Flt-4)** von einer Subpopulation vaskulärer Endothelzellen exprimiert (Dumont et al., 1995; Kaipainen et al., 1995). Die Geninaktivierung von Flt-4 in Mäusen resultierte in einer abnormalen Gefäßorganisation mit schweren kardiovaskulären Defekten und führte zur Letalität um den Tag E9,5 (Dumont et al., 1998). Zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus ist die Expression weitgehend auf lymphatische Endothelzellen beschränkt (Kaipainen et al., 1995). Ausnahmen sind Kapillaren der Glomeruli und sinusoidale Endothelien der Milz und Leber (Partanen et al., 2000). Als essentielle lymphangiogene Faktoren, die ihre Funktion über Flt-4 vermitteln, wurden die beiden vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D beschrieben. Deren Überexpression in der Haut transgener Mäuse resultierte in der Ausbildung eines hyperplastischen lymphatischen Gefäßnetzes, ohne dabei die Blutgefäßbildung zu beeinflussen (Jeltsch et al., 1997). Umgekehrt führte die Expression einer löslichen Flt-4 Mutante in transgenen Tieren zur Hemmung der Lymphangiogenese und Regression bereits bestehender lymphatischer Gefäße (Makinen et al., 2001), und „knock-out“ Studien zeigten, dass VEGF-C als parakriner Faktor für die Lymphangiogenese im Embryo essentiell ist (Karkkainen et al., 2004).

1.2.2 VEGF und Neuropiline

Ursprünglich wurden NRP-1 und NRP-2 auf Axonen von Nervenzellen beschrieben (Chen et al., 1997; He und Tessier-Lavigne, 1997). Dort bilden sie zusammen mit Plexinen Rezeptorkomplexe für Klasse III Semaphorine, die im Nervensystem Signale in der Wegfindung von Axonen liefern (Neufeld et al., 2002). Durch ihre zusätzliche Funktion als Rezeptoren für die Isoformen VEGF-A₁₆₅ (Soker et al., 1998; 2002) und VEGF-A₁₄₅ (Karkkainen et al., 2001) sowie VEGF-B (Makinen et al. 1999), VEGF-C (Neufeld et al., 2002), das viruscodierte VEGF-E (Wise et al., 1999) sowie PlGF-2 (Migdal et al., 1998) wurde eine modulierende Rolle auf die Aktivität von vaskulären Wachstumsfaktoren postuliert. Auch eine direkte VEGF-A vermittelte Interaktion von NRP-1 mit Flk-1 konnte gezeigt werden (Neufeld et al., 2002; Soker et al., 2002). Studien an NRP-1-defizienten Mäusen bestätigten einen komplexen vaskulären Phänotyp. So traten neben disorganisierten Dottersackgefäßen schwere kardiovaskuläre Defekte auf (Kawasaki et al., 1999). Umgekehrt führte die Überexpression von NRP-1 in transgenen

Tieren zu einem hypervaskulären Phänotyp (Kitsukawa et al., 1995). NRP-2 „knock-out“ Mäuse wiesen keinen vaskulären Phänotyp auf (Giger et al., 2000), zeigten aber mitunter Fehlbildungen des lymphatischen Gefäßsystems (Yuan et al., 2002). Dennoch scheint NRP-2 in der Entwicklung embryonaler Blutgefäße eine Rolle zu spielen, da NRP-1/NRP-2-defiziente Mausembryonen einen gesteigerten vaskulären Phänotyp im Vergleich zu NRP-1 „knock-out“ Tieren zeigten und die homozygote Inaktivierung eines Neuropilins bei gleichzeitiger heterozygoter Mutation des anderen (NRP-1^{-/-}/NRP-2^{+/-} oder NRP-1^{+/-}/NRP-2^{-/-}) zu vaskulären Defekten und embryonaler Letalität führte (Takashima et al., 2002).

I.2.3 Angiopoietine und Tie-Rezeptoren

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2 spielen eine zentrale Rolle bei der Remodellierung des primitiven Gefäßplexus zu vaskulären Strukturen (Risau, 1997). Hierbei tritt die Expression wenig später als die der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 auf (Dumont et al., 1995), bleibt im adulten Endothel jedoch erhalten (Wong et al., 1997). Beide Rezeptoren werden auch auf hämatopoetischen Zellen und deren Vorläufern exprimiert, jedoch konnte eine Beteiligung von Tie-1 oder Tie-2 an der embryonalen Hämatopoese nicht bestätigt werden (Rodewald und Sato, 1996). Eine Funktion bei der postnatalen Blutbildung im Knochenmark wurde jedoch postuliert (Puri und Bernstein, 2003).

Bis zum heutigen Stand der Forschung konnte für den Rezeptor **Tie-1** noch kein Ligand identifiziert werden. Alle vier bekannten Angiopoietine binden ausschließlich an Tie-2 (Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997). Die Ausbildung von Tie-1/Tie-2 heterodimeren Komplexen auf Endothelzellen führte jedoch zu der Hypothese, dass Tie-1 einen modulierenden Einfluss auf die Tie-2 Signaltransduktion nehmen könnte (Marron et al., 2000). Studien an „knock-out“ Tieren bestätigten, dass die Tie-Rezeptoren für die Vaskulogenese und frühe Angiogenese nicht essentiell sind (Puri et al., 1999). So führte die Inaktivierung des *tie-1* Gens in Mäusen zum Absterben der Embryonen um den Tag E14 (Puri et al., 1995) oder kurz vor der Geburt (E18) (Sato et al., 1995). Massive Ausbildungen von Hämorrhagien und Ödemen durch Defekte der vaskulären Integrität sowie im Überleben von Endothelzellen konnten beobachtet werden. Größere Gefäße bildeten sich hingegen normal aus (Partanen et al., 1996; Puri et al., 1999). Tie-2-defiziente Embryonen starben an Tag E10,5. Während die Vaskulogenese normal verlief, war die Remodellierung gestört. Es zeigten sich u.a. Defekte in der Differenzierung von

Dottersackgefäßen und im Aussprossen von Gefäßen. Für diesen Phänotyp verantwortlich könnten eine gestörte Rekrutierung von Perizyten oder ein Mangel an Überlebenssignalen für Endothelzellen sein (Dumont et al., 1994; Puri et al., 1999; Sato et al., 1995). Tie-1/Tie-2 Doppelmutanten zeigten denselben vaskulären Phänotyp wie Tie-2-defiziente Mäuse (Puri et al., 1999).

Ang-1 und Ang-4 aktivieren **Tie-2** (Davis et al., 1996; Valenzuela et al., 1999) und es kommt nach Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung der Kinasedomäne zur Aktivierung verschiedener Signalwege. So werden Überlebenssignale durch die PI3 Kinase und Phosphorylierung von Akt vermittelt. Signale über FAK oder das Protein Dok-R aktivieren die Migration der Endothelzellen (Ward und Dumont, 2002). Eine mitogene Antwort oder Ausbildung tubulärer Strukturen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Davis et al., 1996; Koblizek et al., 1998). Im transgenen Tier resultierte die Überexpression von Ang-1 in einer Hypervaskularisierung durch Zunahme der Gefäßgröße (Suri et al., 1998). Ang-1-defiziente Embryonen starben an Tag E12.5 und wiesen keine Beeinträchtigung der Vaskulogenese auf. Die Ausbildung eines hierarchisch geordneten Gefäßnetzes durch Angiogenese und Remodellierung war jedoch gestört (Suri et al., 1996). Dieser Phänotyp gleicht sehr dem Tie-2-defizienter Mäuse und bestätigt die Hypothese, dass das Ang-1/Tie-2 System für die Stabilisierung und Remodellierung der Blutgefäße verantwortlich ist (Davis et al., 1996).

Mit gleicher Affinität wie Ang-1 bindet auch Ang-2 an Tie-2. Eine Ang-2-vermittelte Autophosphorylierung des Rezeptors tritt jedoch nur schwach auf und spricht für einen hemmenden Einfluss von Ang-2 auf die Ang-1-vermittelte Signaltransduktion (Maisonpierre et al., 1997). Diese Hypothese wurde durch die Überexpression von Ang-2 im transgenen Tiermodell bestätigt. Die Embryonen starben aufgrund einer inhibierten embryonalen Gefäßentwicklung, die mit den Phänotypen von Ang-1^{-/-} oder Tie-2^{-/-} Mäusen vergleichbar war (Maisonpierre et al., 1997). Ang-2-defiziente Mäuse entwickelten erst nach der Geburt einen komplexen Phänotyp, der zur Letalität um den Tag P14 führte. Die Tiere zeigten Defekte bei der Remodellierung retinaler Gefäße sowie in der Ausbildung von Lymphgefäßen, die auf eine verschlechterte Assoziation der lymphatischen Endothelzellen mit lymphatischen glatten Muskelzellen zurückzuführen war (Gale et al., 2002).

I.3 Die transkriptionelle Kontrolle der Gefäßentwicklung

Die Regulation der **VEGF-A** Expression erfolgt über unterschiedliche exogene Stimuli und beruht auf einer erhöhten Transkriptions- und Translationsrate sowie einer erhöhten Stabilität der mRNA (Ikeda et al., 1995; Shweiki et al., 1992). Unter hypoxischen Bedingungen im Gewebe, wie sie durch Zellproliferation während der Embryonalentwicklung oder bei der Tumorprogression entstehen, wird die gesteigerte Transkription von VEGF-A primär durch die Aktivität des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 hervorgerufen (Semenza et al., 1999). Posttranskriptionell wird eine erhöhte Stabilität der VEGF-A mRNA durch Bindung des spezifischen Proteins HuR am 3'-untranslatierten Bereich des mRNA-Transkriptes bewirkt (Levy et al., 1998). Zusätzlich erleichtert eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) die Translation (Stein et al., 1998). Neben Hypoxie sind auch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine wie EGF oder PDGF, sowie TGF- β , TNF- α , TNF- β 1 oder IL-1 an der Regulation der VEGF-A Expression beteiligt, und es wurde eine durch das Onkogen *ras* vermittelte Induktion der Expression beschrieben (Breier 2000; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Neufeld et al., 1999). Außerdem regulieren möglicherweise Steroidhormone die Expressionskontrolle während des weiblichen Ovulationszyklus (Garrido et al., 1993; Shweiki et al., 1993).

Die **VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1)** Expression ist ebenso wie die VEGF-A Expression direkt durch Hypoxie induzierbar (Detmar et al., 1997; Gerber et al., 1997). Neben einem Hypoxie-responsiven Element (HRE) ist ein cAMP-responsives Element (CRE) für die Expression des Gens nötig (Morishita et al., 1995; Wakiya et al., 1996). Zudem wurden Transkriptionsfaktoren aus der Ets-Familie (Wakiya et al., 1996) sowie das Zinkfingerprotein Egr-1 (Akuzawa et al., 2000; Vidal et al., 2000) als essentiell für die Transaktivierung des *flt-1* Gens beschrieben.

Die Regulation der **VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1)** Expression wurde ausführlich an transgenen Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass ein 939 bp Fragment des *flk-1* Promotors in Kombination mit einem 2.3 kbp Fragment aus dem ersten Intron des Gens eine starke endothelspezifische Expression des *lacZ* Reportergens vermittelte (Kappel et al., 1999). Das Expressionsmuster des Reportergens stimmte dabei weitgehend mit dem des endogenen Flk-1 überein, trat allerdings erst an Tag E7,7 und damit einen Tag nach der Flk-1 Expression auf (Kataoka et al., 1997). Die funktionelle Analyse des Promotorfragments zeigte, dass Bindungsstellen für NF κ B und CREB für die Aktivität in Endothelzellen wichtig sind (Illi et al., 2000). Für die Reportergenexpression im

transgenen Tier wurde eine Abhängigkeit von Bindungsstellen für Ets-Familienmitglieder und HIF2 α demonstriert (Elvert et al., 2003; Kappel et al., 2000). Die Enhancer Funktion konnte durch Deletionsstudien auf ein 510 bp Fragment eingeengt und eine Abhängigkeit der Aktivität von Ets, SCL/Tal-1, GATA oder HoxB5 Bindungsstellen gezeigt werden (Kappel et al., 2000; Wu et al., 2003).

Die Regulation der **Tie-1** Expression wurde an transgenen Mäusen untersucht, die das *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle des humanen oder murinen *tie-1* Promotors enthielten (Korhonen et al., 1995). Eine Abhängigkeit der Promotoraktivität von zwei doppelten Ets-Bindungsstellen, einer oktameren DNA-Sequenz sowie einer AP-2 Bindungsstelle konnte gezeigt werden (Iljin et al., 1999; Korhonen et al., 1995). Darüber hinaus bestätigten *in vitro* Studien eine Induktion der Promotoraktivität unter Hypoxie, während veränderter Strömungseigenschaften oder TNF- α negativ regulatorisch wirkten (Chen-Konak et al., 2003).

Auch die Regulation der **Tie-2** Expression wurde an transgenen Mäusen analysiert. Ein Promotorfragment der 5'UTR in Kombination mit einem Enhancerfragment aus dem ersten Intron des *tie-2* Gens vermittelten eine vollständige endothelzellspezifische Expression des Reportergens während der Embryonalentwicklung, die auch im adulten Gefäßsystem bestehen blieb (Schlaeger et al., 1995, 1997). Deletionsanalysen bestätigten eine Abhängigkeit beider regulatorischen Elemente von Bindungsstellen für Ets-Faktoren (Minami et al., 2003; Schlaeger et al., 1997). *In vitro* konnte eine Transaktivierung der Promotoraktivität durch die Ets-Faktoren NERF-2 und Elf-1 gezeigt werden (Dube et al., 1999; 2001). Analog zu Tie-1 wurde zudem eine Abhängigkeit der Promotoraktivität von einer oktameren DNA-Sequenz bestätigt (Fadel et al., 1999).

Maßgeblich an der transkriptionellen Regulation endothelialer Rezeptoren beteiligt sind Mitglieder der **Ets-Familie**. Diese umfasst eine Gruppe von mehr als 50 Faktoren, die alle über ein als ETS Domäne bezeichnetes konservierte Helix-Schleife-Helix DNA-Bindungsmotiv verfügen (Lelievre et al., 2001; Sharrocks, 2001). Ets-Bindungsstellen (EBS) wurden in einer Reihe von zellulären Promotoren gefunden, die u.a. für zahlreiche endothelzellspezifische Proteine codieren. So wurde *in vitro* die Transaktivierung der Promotoren der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Flt-1 (Morishita et al., 1995; Wakiya et al., 1996), Flk-1 (Elvert et al., 2003; Kappel et al., 1999), Tie-1 (Iljin et al., 1999) und Tie-2 (Schlaeger et al., 1997) sowie von Matrix-degradierender Proteasen und deren Inhibitoren (Gum et al., 1996; Iwasaka et al., 1996) oder Adhäsionsproteinen (Bottinger et al., 1994; de Launoit et al., 1998; Gory et al., 1998) durch Ets-Faktoren demonstriert.

Bereits in Blutinseln des Dottersacks lassen sich Ets-1 Transkripte nachweisen und sprechen für eine frühe Expression des Transkriptionsfaktors in Hämangioblasten (Pardanaud und Dieterlen-Lievre, 1993; Queva et al., 1993). Die Expression ist während der gesamten Embryonalentwicklung in Endothelzellen während des Prozesses der Vaskulogenese und Angiogenese zu beobachten (Vandenbunder et al., 1989; 1994), tritt allerdings auch in mesenchymalen Zellen bei der Morphogenese von Organen auf (Grevin et al., 1993; Queva et al., 1993). Studien an *ets-1* „knock-out“ Mäusen zeigten, dass trotz prädominanter Expression in Endothelzellen und deren Vorläufern sowie dessen Beteiligung an der transkriptionellen Regulation angiogener Prozesse Ets-1 für die Gefäßbildung im Embryo nicht essentiell ist (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). Eine mögliche Erklärung könnte die endothelzellspezifische Co-Expression anderer Ets-Familienmitglieder wie Erg oder Fli-1 sein, was für eine funktionale Redundanz dieser Transkriptionsfaktoren spricht (Lelievre et al., 2001; Maroulakou und Bowe, 2000). Stattdessen weist der Phänotyp Ets-1-defizienter Tiere auf eine maßgebliche Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors bei der Differenzierung der lymphoidalen Zelllinien hin (Barton et al., 1998; Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995; Walunas et al., 2000). In Endothelien adulter Gefäße ist Ets-1 nicht detektierbar. Die Expression wird aber bei angiogenen Prozessen während der Wundheilung, der inflammatorischen Angiogenese sowie der Vaskularisierung von Tumoren transient reaktiviert (Bolon et al., 1995; 1996; Wernert et al., 1992; 2002). In diesem Zusammenhang wurde eine Zunahme der Ets-1 Expression in Endothelzellen und vaskulären Muskelzellen als Antwort auf angiogene Faktoren wie VEGF-A, TNF- α , bFGF, TGF- β oder HGF bestätigt (Iwasaka et al., 1996; Wernert et al., 1992).

Neben Ets Faktoren sind die **Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF)** essentielle transkriptionelle Regulatoren der Gefäßbildung. HIFs sind Transkriptionsfaktoren, die als Heterodimere aus einer der drei α -Untereinheiten (HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α) mit der HIF1 β (ARNT 1-3) Untereinheit wirken. Sie verfügen über ein basisches Helix-Schleife-Helix (bHLH) DNA-Bindungsmotiv, das zusammen mit den PAS A und PAS B Domänen die Bindung an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) der DNA vermittelt. Während die ARNT Untereinheit unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Zelle ubiquitär exprimiert wird (Brahimi-Horn et al., 2001; Kewley et al., 2004) und primär im Zellkern vorliegt (Chilov et al., 1999), ist die Stabilität der α -Untereinheiten durch Hypoxie regulierbar (Gradin et al., 1996; Huang et al., 1996). Unter normoxischen Bedingungen werden die HIF α Proteine durch enzymatische Modifikationen für den proteasomalen Abbau markiert.

Hierzu vermitteln die sauerstoffabhängigen Prolinhydroxylasen PHD1-4 die Hydroxylierung zweier Prolinreste von HIF α , die vom van Hippel-Lindau Protein (pVHL) gebunden werden. Als Teil des E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes katalysiert pVHL die Übertragung von poly-Ubiquitin-Ketten auf HIF α und markiert es für den proteasomalen Abbau. Die Acetylierung eines Lysinrestes durch das Enzym ARD-1 fördert zusätzlich die Interaktion von pVHL mit HIF α und resultiert in einer gesteigerten Degradation von HIF-1 α (Jeong et al., 2002). Zudem wirken weitere posttranslationale Modifikationen modulierend auf die Aktivität der α -Untereinheiten (Conrad et al., 1999; Gradin et al., 2002; Richard et al., 1999; Lando et al., 2002)

Neben Genen aus dem Energiemetabolismus und der Erythropoese ist der potente angiogene Faktor VEGF eines der wesentlichen hypoxieregulierten Zielgene. *In vitro* wiesen kultivierte Endothelzellen unter Hypoxie eine Induktion der VEGF Expression auf (Liu et al., 1995) und führte die adenovirale Überexpression von HIF1 zu einer verstärkten Expression von VEGF und anderer angiogener Faktoren wie PlGF, Ang-1 und Ang-2 (Kelly et al., 2003; Yamakawa et al., 2003). Ebenso zeigten VEGF-Rezeptoren eine Stimulation unter Hypoxie. Kultivierte Endothelzellen exprimierten unter Sauerstoffmangel vermehrt Flt-1 und Flk-1 auf Proteinebene (Waltenberger et al., 1996). Reporterstudien und Mutationsanalysen *in vitro* demonstrierten die Abhängigkeit des *flk-1* Promotors vom HIF-System. So konnte der stimulatorische Effekt von HIF2, nicht aber von HIF1, auf die Promotoraktivität bestätigt werden (Kappel et al., 1999). Dabei erfolgt die Bindung von HIF2 α an ein HRE-ähnliches Motiv (HBS) in direkter Nachbarschaft einer Ets-Bindungsstelle, die somit zusammen ein positiv-regulatorisches Element bilden (HBS/EBS). HIF2 interagiert mit Ets-1 und wirkt kooperativ auf die *flk-1* regulierte Reporterexpression. Innerhalb des Promotors befinden sich zwei HBS/EBS Elemente, die beide für eine vollständige endothelzellspezifische Reporterexpression im transgenen Embryo essentiell sind (Elvert et al., 2003).

Während der Embryonalentwicklung wird HIF1 α ubiquitär (Jain et al., 1998), HIF2 α hingegen prädominant in Endothelzellen exprimiert (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Tian et al., 1997). Inaktivierungstudien bestätigten, dass sowohl HIF1 α (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998) als auch ARNT (Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997) für die embryonale Entwicklung essentiell sind. Die Embryonen zeigten u.a. Defekte in der Herzentwicklung und Ausbildung von Dottersackgefäßen. Unabhängige Studien zur Inaktivierung von *hif2 α* hingegen resultierten in sehr unterschiedlichen Phänotypen (Compernelle et al., 2002; Peng et al., 2000; Tian et al., 1997). Trotz prädominant

endothelzellspezifischer Expression trat lediglich in einer Studie ein abnormaler vaskulärer Phänotyp auf, der durch eine gestörte Ausbildung der Dottersackgefäße gekennzeichnet war (Peng et al., 2000). Neuste *in vivo* Studien sprechen jedoch für HIF2 α als essentiellen intrinsischen Faktor bei der transkriptionellen Regulation endothelialer Rezeptoren. So führte die Blockierung von HIF-Signalwegen durch endothelzellspezifische Überexpression einer dominant-negativen Deletionsmutante (dnHIF2) zu massiven Störungen der physiologischen Angiogenese und der Herzentwicklung, die auf eine verminderte Expression der endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Flt-1, Flk-1 und Tie-2 zurückzuführen war (Licht et al., eingereicht). Umgekehrt resultierte die adenovirale Überexpression von HIF2 α im murinen Wundheilungsmodell in einer Induktion der Expression dieser Rezeptoren (Takeda et al., 2004).

Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren der frühen Gefäßentwicklung sind SCL/Tal (Kallianpur et al., 1994) und GATA-2 (Dorfman et al., 1992) sowie Faktoren der Hox Familie (Gorski und Walsh, 2000). Diese wurden in Co-Expression mit Markern von Endothelzellen oder deren Vorläufern beschrieben, werden an dieser Stelle aber nicht weiter besprochen.

I.4 Tumorangiogenese

Ab einer gewissen Größe des malignen Zellklons, nämlich dann, wenn die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen über die Diffusion allein nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, ist der Tumor auf die Neubildung eines tumoreigenen Gefäßsystems angewiesen. Eine weitere Größenzunahme wäre sonst nicht mehr möglich. Bilden sich keine Gefäße aus, so können Tumorzellaggregate von ca. 10^5 - 10^6 Zellen mit einer Größe von wenigen Kubikmillimetern über Monate oder Jahre verharren (Gastl et al., 1997; Hori et al., 1991), bis sie angiogene Signalwege aktivieren (Folkman, 2002). Diese Aktivierung erfolgt durch einen Prozess, der als „angiogener Switch“ bezeichnet wird (Hanahan und Folkman, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000). Dieser Hypothese zufolge ist das Verhältnis von Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese für die Gefäßneubildung verantwortlich. Während unter physiologischen Bedingungen das Fehlen von Stimulatoren oder eine erhöhte Konzentration von Inhibitoren angiogene Prozesse verhindert, induziert die Verschiebung dieser Balance den „angiogenen Switch“ und führt zur pathologischen Gefäßneubildung. Eine Übersicht der wichtigsten Stimulatoren und Inhibitoren der Tumorangiogenese zeigt Tabelle I.1.

endogene pro-angiogene Faktoren	endogene anti-angiogene Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> • VEGF-A • Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF) • Fibroblasten Wachstumsfaktoren (aFGF und bFGF) • Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) • Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) • epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) • Plättchen Wachstumsfaktor (PDGF) • transformierender Wachstumsfaktor (TFG-α, TFG-β) • Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) • Interleukin-8 (IL-8) 	<ul style="list-style-type: none"> • sVEGFR • Angiostatin • Endostatin • Tumstatin • Thrombospondine (TSP-1, TSP-2) • Vasostatin • Plättchenfaktor 4 (PF4) • Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP-1, -2, -3) • Interferone (INF-α, -β, -γ) • Interferon-induzierbares Protein (IP-10) • Interleukine (IL-1, -4, 12)

Tab. I.1 Übersicht der wichtigsten pro- und anti-angiogenen Faktoren

Maßgeblicher Regulator der Neovaskularisierung von Tumoren ist der Sauerstoffgehalt. Tumorzellen, die mehr als 100-200 μm , der maximalen Diffusionsstrecke von Sauerstoff, vom nächsten Gefäß entfernt sind, werden hypoxisch. Klinische Studien zeigten, dass Hypoxie einer der entscheidenden Stimuli der Tumorangiogenese ist (Shweiki et al., 1992), mit der Tumorprogression (Hockel et al., 1996; Zhong et al., 1999) sowie Metastasierung (Brizel et al., 1996; Rofstad, 2000) korreliert und negativ auf die Effektivität von Standardtherapien wirkt (Brown, 2000). Durch den lokalen Sauerstoffmangel kommt es zur Stabilisierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF), die wiederum die Expression an der Angiogenese beteiligter Zielgene wie VEGF-A, PlGF, Flk-1, Tie-2 sowie Ang-1 und Ang-2 induzieren. Darüber hinaus ist das Gefäßsystem eines Tumors in hohem Maße disorganisiert und teilweise nicht funktional. Der Blutfluss ist weniger strikt reguliert (Baish und Jain, 2000), wodurch zusätzlich hypoxische Regionen entstehen können (Helmlinger et al., 1997). Weiterhin zeigt sich eine verminderte Interaktion zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen, wodurch neue Gefäße weniger stabilisiert sind. Eine fehlende oder diskontinuierliche Basalmembran, erweiterte interendotheliale Verbindungen und Fenestrierungen des Endothels führen zudem zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und damit zu einem erhöhten Tumorrinnendruck (Dvorak et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998).

Derzeit werden mehrere Modelle der Tumorangiogenese diskutiert (Abb. I.2). Die gängigste Hypothese geht davon aus, dass zu Beginn der Tumor als avaskuläres Zellaggregat vorliegt. Hypoxische Bereiche innerhalb des Tumorgewebes induzieren den

„angiogenen Switch“ wodurch die Expression von VEGF in Tumorzellen (Plate et al., 1992) und Stromazellen (Fukumura et al., 1998) stimuliert wird. Zusammen mit Ang-2 und Flk-1, deren Expression stark in den Tumorendothelzellen induziert wird (Zagzag et al., 1999), bewirkt die erhöhte VEGF Konzentration eine angiogene Antwort. Diese erfolgt durch *Aussprossen* benachbarter Gefäße der Tumorperipherie oder durch *Intussuszeption* (Patan et al., 1996b). Auch die Beteiligung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wurde für dieses Modell der Tumorangiogenese postuliert (Asahara et al., 1997; 1999a; 1999b; 2000; Rafii, 2000). Analysen an Tiermodellen bestätigten die Rekrutierung zirkulierender endothelialer und hämatopoetischer Vorläuferzellen bei der Neovaskularisierung experimenteller Tumoren (Lyden et al., 2001). Dieses Modell wird primär in Bezug mit epithelialen Tumoren diskutiert, die räumlich durch eine Basalmembran vom Gefäßsystem separiert sind. Ebenso beschreibt es den Prozess der Vaskularisierung experimenteller Tumoren, die durch subkutane, intracorneale oder intravitreale Inokulation von Tumorzellen entstehen, da diese Bereiche in der Regel avaskulär sind.

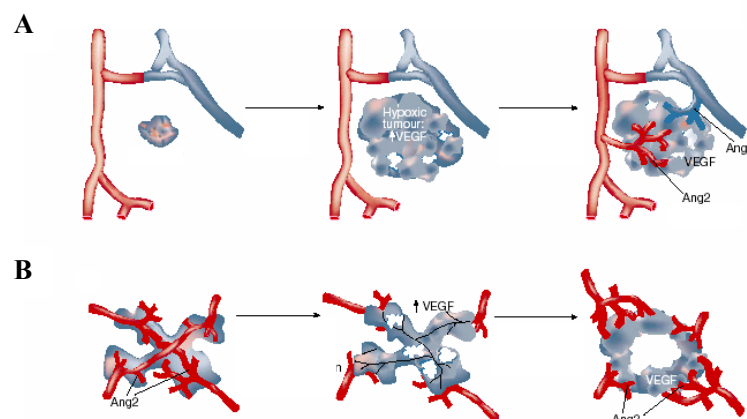


Abb. I.2 Modelle der Tumorangiogenese

A. Tumorwachstum durch Sprossung oder Intussuszeption. Im zunächst avaskulären Tumorgewebe entstehen durch Proliferation hypoxische Bereiche, die zu einer Induktion der Expression von VEGF führen, so dass vorhandene Gefäße in den Tumor einsprossen. **B. Tumorwachstum entlang von bestehenden Gefäßen (Kooption).** Durch autokrine Expression von Ang-2 bilden sich die okkupierten Gefäße zurück, so dass erst sekundär ein avaskulärer, hypoxischer Tumor entsteht. Durch Induktion der VEGF Expression wird die Neovaskularisierung induziert (entnommen aus Yancopoulos et al., 2000).

Ein weiteres Modell der Tumorangiogenese wird als *Kooption* bezeichnet (zusammengefasst bei Yancopoulos et al., 2000). Dabei schließen Tumorzellen bereits existierende Gefäße ein, so dass primär ein gut vaskularisierter Tumor entsteht. Im folgenden Prozess bilden sich durch die autokrine Ang-2 Expression im Endothel, die noch vor der VEGF-A/Flk-1 Expression induziert wird, die okkupierten Gefäße zurück. Diese Gefäßregression ist zurückzuführen auf eine verminderte Interaktion von Endothelzellen und Perizyten sowie einer gesteigerten Apoptoserate von Endothelzellen. Erst sekundär entsteht ein avaskulärer und hypoxischer Tumor, wodurch schließlich angiogene Prozesse aktiviert werden. Die Hypoxie-induzierte Expression von VEGF in der Tumorzelle und von Ang-2 in den Endothelien vermitteln dabei die Neovaskularisierung (Holash et al., 1999a; 1999b). Diesem Modell widersprechen Studien an Tumoren, die bereits unter normoxischen Bedingungen VEGF exprimieren (Goldbrunner et al., 1999; Plate et al., 1993; Shweiki et al., 1995). Diese Tumoren induzierten unabhängig von Größe und Sauerstoffgehalt des Tumorgewebes die Aussprossung von Gefäßen. Parallel okkupierten Tumorzellen bestehende Gefäße, um sie als Pfad für eine invasive Ausbreitung ins benachbarte Gewebe zu nutzen. Dies ging mit einer simultanen Induktion der Flk-1 und Ang-2 Expression in tumoralen und peritumoralen Endothelien einher und führte zu der Hypothese, dass die Remodellierung des Gefäßsystems letztendlich von der Balance zwischen VEGF und Ang-2 abhängig ist (Vajkoczy et al., 2002).

I.5. Anti-angiogene Strategien der Tumorthherapie

Da Wachstum, Progression und Metastasierung vieler maligner Tumoren angiogenesabhängig ist, stellt die spezifische Hemmung angiogener Prozesse während der Entwicklung solider Tumoren eine zusätzliche Therapiemöglichkeit dar. Hierbei ist der wesentliche Vorteil gegenüber konventionellen Chemotherapien, dass anti-angiogene Substanzen hauptsächlich mit den Aktivitäten der Endothelzellen interferieren, die aufgrund ihrer genetischen Stabilität nur eine sehr geringe Mutationsrate zeigen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung gegen das therapeutische Agens weitaus niedriger, was Studien bestätigten (Boehm et al., 1997).

Da die Tumorangiogenese nach einer bestimmten Sequenz abläuft, ergeben sich mehrere zielgerichtete therapeutische Strategien. Zur Gruppe der *Antagonisten der Endothelzellmigration* gehören Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen und der $\alpha v \beta_3$ -Integrinfunktion (zusammengefasst bei Ruegg et al., 2002; Rudek et al., 2002; Kumar

2003). Durch Hemmung der Proteasen wird die zur Migration notwendige Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) verhindert, während die Blockade der endothelialen Integrinfunktion die zur Migration nötige Adhäsion der Endothelzellen an die ECM inhibiert. Beide anti-angiogene Strategien wurden in experimentellen Tumormodellen bestätigt (Maquoi et al., 2004; Reinmuth et al., 2003). Auch das humane Tumstatin (Maeshima et al., 2000) bzw. Endostatin (O'Reilly et al., 1997), zwei endogene Angiogeneseinhibitoren, die durch proteolytische Spaltung von Kollagen IV bzw. XVIII entstehen, vermitteln ihre anti-angiogenen Eigenschaften durch die Bindung an $\alpha v \beta_3$ - bzw. $\alpha 5 \beta_1$ -Integrine (Sudharka et al., 2003). Beide Inhibitoren, wie auch Angiostatin (O'Reilly et al., 1994), gehören zur Gruppe der *Antagonisten der Endothelzellproliferation*, die endogen erst durch proteolytische Spaltung eines größeren Moleküls ohne anti-angiogene Eigenschaften freigesetzt werden. Deren inhibitorischen Eigenschaften wurden durch Überexpressionstudien an verschiedenen Tumormodellen bestätigt (zusammengefasst bei Cao 2001).

Da jedoch VEGF als der wichtigste Regulator der Angiogenese identifiziert wurde, richten sich die meisten Studien zur Etablierung einer anti-angiogenen Therapie auf die *Antagonisten des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems*. In zahlreichen Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Applikation neutralisierender monoklonaler anti-VEGF Antikörper (Asano et al., 1995; Borgstrom et al., 1998; Kim et al., 1993; Warren et al., 1995) oder anti-Flk-1 Antikörper (Sweeney et al., 2002; Zhang et al., 2002) sowie die Überexpression löslicher VEGFR-2 Fragmente (Kou et al., 2004; Lin et al., 1998; Tseng et al., 2002) oder Mutanten der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Heidenreich et al., 2004; Machein et al., 1999; Millauer et al., 1996) anti-angiogene Effekte erzielten. Niedermolekulare Verbindungen, die selektiv die Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Flk-1 inhibierten (Ciardiello et al., 2004; Mendel et al., 2000; Ruggeri et al., 2003; Sun et al., 2004), sowie die spezifische Degradation der mRNA von VEGF oder deren Rezeptoren (Pavco et al., 2000; Takei et al., 2004) resultierten ebenso in gehemmten Wachstum und Metastasierung solider experimenteller Tumoren. Darüber hinaus zeigten Studien an Tiermodellen, dass eine anti-VEGF Behandlung in Kombination mit einer Chemotherapie (Klement et al., 2000) oder Bestrahlungstherapie (Lee et al., 2000; Kozin et al., 2001) Monotherapien signifikant überlegen ist.

Zahlreiche VEGF-Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Studien. Eine Übersicht dieser anti-angiogenen Therapiekonzepte gibt Tabelle I.2. Erst kürzlich wurde die weltweit erste erfolgreiche Phase-III-Studie bei metastasierenden kolorektalen

Karzinomen mit dem monoklonalen und rekombinant humanisierten VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin, Genentech) präsentiert, welche das Behandlungskonzept der Anti-Angiogenese bestätigte (Hurwitz et al., 2004). Die signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Patienten unter der Kombinationstherapie Chemotherapie (Irinotecan, Fluorouracil, und Leucovorin) mit Bevacizumab betrug 30% im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Chemotherapie + Plazebo) und zeigte eine sehr gute Verträglichkeit. Neben einer geringeren Anzahl zirkulierender Endothelzellen und deren Vorläuferzellen führte die Behandlung mit Bevacizumab zu einer signifikanten Abnahme der Perfusion, des vaskulären Volumens und der mikrovaskulären Kapillardichte innerhalb des Tumors, wodurch ein verminderter interstitieller Innendruck den Zugang der Chemotherapeutika in das tumorale Gewebe erleichterte (Willett et al., 2004).

Agenz	Beschreibung	Firma	Status
Bevacizumab (Avastin)	hum m α -VEGF-A	Genentech	FDA getestet
PTK787	RTK Inhibitor (VEGFR-1 und VEGFR-2)	Novartis	Phase-III
Bay 43-9006	RAF Kinase Inhibitor (auch div. RTK)	Bayer/Onyx	Phase-III
SU11248	RTK Inhibitor (div. RTK)	Pfizer	Phase-I/II
AG 013676	RTK Inhibitor (div. RTK)	Pfizer	Phase-II
ZD6474	RTK Inhibitor (VEGFR-1 und VEGFR-2)	AstraZeneca	Phase-II
VEGF-trap	löslicher Rezeptor	Regeneron	Phase-I/II
anti-VEGFR2	mAb	ImClone	Phase-I

Tab. I.2 Übersicht von VEGF-Inhibitoren in klinischen Studien

(α) anti, (div.) verschiedene, (hum) humanisierter, (m) monoklonal, (RTK) Rezeptor-Tyrosin-Kinase, (VEGF) Gefäßendothelzellwachstumsfaktor, (VEGFR) VEGF Rezeptor
(entnommen aus Ferrara et al., 2004)

I.6 Avidin-Biotin-Technologie

Die vielfältige Anwendung der Avidin-Biotin-Technologie für pharmakologische, diagnostische sowie therapeutische Fragestellungen ist auf die außergewöhnlich hohe Affinität von Avidin (Av) zu Biotin zurückzuführen (Green, 1975). Avidin besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils zur Bindung eines Biotinmoleküls fähig sind (Green, 1975). Diese nicht-kovalente Interaktion ist mit einer Dissoziationskonstante von $K_d=10^{-15}$ M die stärkste in der Natur vorkommende und ist durch die Ausbildung von 36 Hydrogenbindungen und ~ 100 van der Waalskräften annähernd irreversibel (Rosano et al., 1999). Endogen liegt **Avidin** als basisches Glykoprotein im Eiklar und Gewebe von Amphibien, Reptilien und Vögeln vor. Das bakterielle Homolog Streptavidin (sAv) verfügt über vergleichbare Bindungseigenschaften, ist hingegen nicht glykosyliert und

neutral. **Biotin** ist als wasserlösliches Vitamin H für Säugerzellen essentiell. Endogen dient es durch seine CO₂-bindende Eigenschaft als prosthetische Gruppe vier verschiedener Biotin-abhängiger Carboxylasen und spielt eine entscheidende Rolle in metabolischen Prozessen (Moss und Lane, 1971). Biotin enthält in seiner molekularen Struktur einen bizyklischen Ring, der die Interaktion mit Av oder sAv vermittelt. Über die Seitenkette der Aminosäure Valerin wird die Synthese biotinylierter Konjugate wie Radionuklide, Zytokine oder Liposomen gewährleistet (Wilbur et al., 1999).

Derzeit werden Avidin und Streptavidin für die klinische und/oder diagnostische Anwendung von Antikörpern genutzt, um eine Bindung von Therapeutika zu vermitteln oder die Spezifität von Immuntherapien zu verbessern (zusammengefasst bei Boerman et al., 2003). Diese so genannten „pretargeting“ Modelle basieren auf der systemischen Applikation eines monoklonalen Antikörpers (mAb) gerichtet gegen ein tumorspezifisches Epitop (Schritt 1). Dieser ist biotinyliert (mAb-b), und vermittelt die Avidinylierung des Tumors (Schritt 2), so dass im dritten Schritt die Akkumulation des systemisch verabreichten biotinylierten Konjugates am Tumor erreicht wird (3-Schritt Modell). Durch die Verwendung eines Immunglobulins (mAb-b) zur Markierung des Zielgewebes spricht man von einer „pretargeting Immuntherapie“ (Abb. I.3). Weiterentwicklungen dieses Systems zur Reduktion unspezifischer Bindungen beruhen auf den unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften von Av und sAv (Rosebrough, 1993; Schechter et al., 1990) und führten zur Etablierung so genannter 5-Schritt Modelle (zusammengefasst bei Boerman et al., 2003). In der Diagnostik und Therapie von Lungen- und Ovarialkarzinomen (Kalofonos et al., 1990; Magnani et al., 2000) sowie von colorektalen Krebserkrankungen (Paganelli et al., 1991) oder Gliomen (Paganelli et al., 1999) fanden Avidin-Biotin-basierende Mehrschritt-Methoden bereits

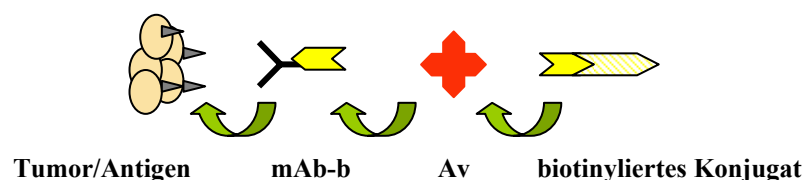


Abb. I.3 Prinzip der 3-Schritt „pretargeting Immuntherapie“

Der gegen das Tumorentigen gerichtete monoklonale Antikörper ist biotinyliert. Im zweiten Schritt erfolgt die Avidinylierung des markierten Tumorgewebes, das die Bindung des im dritten Schritt verabreichten biotinylierten Konjugates, z.B. eines Radionuklids, vermittelt. (mAb-b) biotinylierter monoklonaler Antikörper, (Av) Avidin, (sAv) Streptavidin

Anwendung. Klinische Studien bestätigten den Vorteil von „pretargeting“ Modellen im Vergleich zur direkten Anwendung radioaktiv markierter mAb bei der Radioimmuntherapie maligner Tumoren (Grana et al., 2002; Magnani et al., 2000; Paganelli et al., 1999; 2001). Diese Studien zeigten, dass Avidin-Biotin-basierende Methoden prinzipiell vom Organismus gut toleriert werden. Dennoch sind Immunreaktionen durch Verabreichung des mAb nicht ausgeschlossen. Ein weiteres wesentliches Problem der Methode ist der hohe Tumordruck, der zu schlechten Penetrationsindices des mAb ins Tumorgewebe führt. Zudem müssen für jeden therapeutischen oder diagnostischen Ansatz neue mAb generiert werden.

I.7 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin

Lodavin (Lehtolainen et al., 2003) und Scavidin (Lehtolainen et al., 2002) sind membranständige Fusionsproteine. Sie bestehen aus Anteilen eines endozytotischen Rezeptors dessen ursprüngliche Domäne zur Ligandenbindung deletiert und durch Avidin ersetzt wurde. **Lodavin** basiert auf Anteilen des humanen *low density lipoprotein receptor* (LDL-R). Dieser besteht aus 5 Domänen und reguliert als monomeres Glykoprotein die Bindung, Internalisierung und Degradierung der Lipoproteine LDL und vLDL aus dem Plasma (Goldstein und Brown, 1977). Innerhalb von Lodavin ist die aminoterminalen Ligandenbindungsdomäne des LDL-R deletiert und durch Avidin ersetzt. Die beiden glykosylierten Domänen, verantwortlich für die Konformation und das Recycling des Rezeptors, die Transmembrandomäne (TM) sowie die zytoplasmatische Domäne (CP) zur Regulation der Endozytose und Einlagerung in Clathrin-haltige Bereiche der Zellmembran sind erhalten (Abb. I.4, links).

Scavidin enthält Anteile des bovinen Scavenger Rezeptor A (SR-A). SR-A gehört zur großen Familie der Scavenger Rezeptoren, die primär auf Makrophagen exprimiert werden (Terpstra et al., 2000). Als trimere Membranproteine sind sie an der endozytotischen Aufnahme einer Vielzahl von Liganden beteiligt, wie z.B. von modifizierten Lipoproteinen, Bakterien oder apoptotischen Zellen (Brown und Goldstein, 1986; Krieger, 1997; Platt et al., 1999). Hierzu erfolgt die Ligandenbindung über drei verschiedene Domänen, eine Cystein-reiche, eine Kollagen-artige und eine α -helikale Domäne, die sich im Carboxy-Terminus des Rezeptors befinden. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang von SR-A bei der Regulation der Zelladhäsion gezeigt werden (de Winther et al., 2000). Innerhalb von Scavidin sind zwei der drei Ligandenbindungsdomänen des SR-A deletiert und durch Avidin ersetzt. Die α -helikale

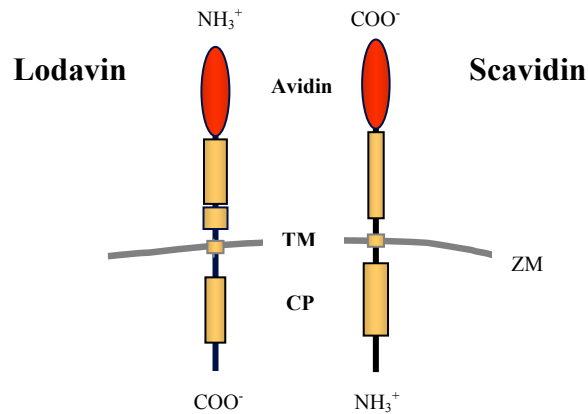


Abb. I.4 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin

Lodavin. Die cytoplasmatische Domäne (CP), Transmembrandomäne (TM) sowie die beiden glykosylierten extrazellulären Domänen des humanen LDL-R sind erhalten. Die Avidindomäne zur Bindung des Liganden befindet sich am Amino-Terminus des Fusionsproteins. **Scavidin.** Die cytoplasmatische Domäne (CP), Transmembrandomäne (TM) sowie die extrazelluläre α -helikale Domäne des SR-A sind erhalten. Die Avidindomäne befindet sich am Carboxy-Terminus des Proteins. (ZM) Zellmembran

Domäne, die zusätzlich die Trimerisierung des Rezeptors und Freisetzung des gebundenen Liganden im sauren Milieu vermittelt, die Transmembrandomäne (TM), sowie die cytoplasmatische Domäne (CP) zur Regulation der Endozytose und Einlagerung in die Clathrin-haltige Zellmembran sind erhalten (Abb. I.4, rechts).

Vorherrschend liegen Lodavin und Scavidin als Tetramere vor. Dabei regulieren die Rezeptoranteile die Lokalisierung in der Zellmembran und die Endozytose eines an die Avidindomäne gebundenen Liganden. Letzterer ist Biotin oder ein biotinyliertes Konjugat. *In vivo* Studien experimenteller BT₄C Gliome, die Lodavin oder Scavidin exprimierten, demonstrierten die Funktionalität der Fusionsproteine (Lehtolainen et al., 2002; 2003). So führte die intratumorale Applikation eines biotinylierten Liganden zu dessen spezifischer Akkumulierung ausschließlich in den Regionen des Tumorgewebes, die eine Expression von Lodavin oder Scavidin aufwiesen. Eine unspezifische Bindung wurde nicht beobachtet.

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von Biotin, die eine Kopplung an Chemotherapeutika, Radionuklide oder Zytokine zulassen sowie seiner außergewöhnlich hohen Affinität zu Avidin, könnte die gewebespezifische Expression der Fusionproteine für therapeutische oder diagnostische Anwendungen von großem Nutzen sein. Denkbar wären gentherapeutische 2-Schritt Modelle. Der spezifischen Expression von Lodavin oder Scavidin im Zielgewebe folgt die systemische Verabreichung des biotinylierten

Konjugates. Im Rahmen von Therapien umschließt dies die Generierung und systemische Applikation biotinylierter Chemotherapeutika, β -Transmitter wie Yttrium, biotinylierter Liposomen oder polymerer Nanopartikel als Transportvehikel für Zytokine oder inhibitorische Faktoren. Auch die Verwendung des Lodavin/Scavidin-Systems zur Verbesserung bildgebender Verfahren ist denkbar. Die Applikation biotinylierter γ -Transmitter wie ^{99}Tc für Szintigraphien oder biotinylierter Kontrastmittel wie den paramagnetischen Kationen Gadolinium oder Dysprosium sowie supramagnetischer Nanopartikel könnte bei Magnetresonanztomographien Einsatz finden und zu einer höheren räumlichen Auflösung führen. Durch die hohen Bindungskräfte wären nur niedrige Konzentrationen nötig, die selektiv und spezifisch im Zielgewebe akkumulieren. Toxische Nebenwirkungen sowie Strahlenbelastungen für den Patienten könnten minimiert und therapeutische Effekte lokal erhöht werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Avidin-Biotin-basierenden Methoden entfallen der kritische Schritt der Antigen-Antikörper-Interaktion zwischen Epitop des Zielgewebes und mAb-b sowie mögliche Immunreaktionen, Neutralisationen oder der rasche Abbau des verabreichten mAb-b.

I.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei neuartige Strategien als Modelle zur anti-angiogenen Therapie experimenteller Tumoren etabliert werden. Diese basierten auf der Expression der therapeutischen Gene *Lodavin* und *Scavidin* sowie auf der Hemmung der transkriptionellen Kontrolle der Gefäßneubildung in Tumoren.

Um eine Anwendung von *Lodavin* und *Scavidin* für klinisch relevante Fragestellungen bei Tumorerkrankungen zu untersuchen, sollten im ersten Teil der Arbeit geeignete *in vivo* Modelle zur zellspezifischen Expression der Fusionsproteine erstellt werden. Der wesentliche Teil der Arbeit zielte dabei auf die Etablierung eines endothelzellspezifischen *in vivo* Modells und umschloss die Generierung transgener Tiere sowie den retroviralen Gentransfer im Wildtyp-Tier. Zusätzlich sollte ein induzierbares, tumorzellspezifisches Modell erstellt werden. Durch Ark Therapeutics, London, sowie durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seppo Ylä-Herttuala am I.A. Virtanen Institut der Universität Kuopio, Finnland, sollten biotinylierte Chemotherapeutika bzw. Radionuklide generiert werden und an den in dieser Arbeit etablierten *in vivo* Modellen getestet werden. Das System sollte als neuartiges Modell für den spezifischen Transport systemisch verabreichter Konjugate zum Zielgewebe analysiert und als Alternative zu herkömmlichen „pretargeting“ Modellen für die Therapie und/oder Diagnostik maligner Erkrankungen diskutiert werden.

Die Neovaskularisierung von Tumoren bedarf einer fein regulierten transkriptionellen Kontrolle der an der Angiogenese beteiligten Gene. Hierbei spielt u.a. der Transkriptionsfaktor Ets-1 eine entscheidende Rolle, dessen transiente Expression mit der Aktivierung von Endothelzellen assoziiert ist. Untersuchungen an Modellen der physiologischen Angiogenese zeigten einen positiven Einfluss dieses Faktors auf eine Vielzahl endothelzellspezifischer Promotoren. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss dieser Faktor auf die Tumorangiogenese *in vivo* hat. Hierzu sollten Ets-1 Signalwege während des Wachstums experimenteller Tumoren blockiert werden. Durch retrovirale Überexpression einer dominant-negativen Deletionsmutante (dnEts-1) sollte analysiert werden, ob die Hemmung der transkriptionellen Kontrolle Ets-1-abhängiger Zielgene Auswirkung auf die Gefäßentwicklung hat und damit die Tumorprogression negativ beeinflusst.

II. Material und Methoden

Die folgenden Arbeitsprotokolle basieren im Wesentlichen auf den Methodensammlungen von Ausubel et al. (1994) und Sambrook et al. (1989).

II.1 Geräte

Zentrifugen: Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Zürich, CH)

Tischzentrifuge "Centrifuge" 5415 C (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge 4-10 (Sigma, Deisenhofen)

Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge 4K10 (Sigma, Deisenhofen)

Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Zürich, CH)

Rotor A 8.24 (Kontron, Zürich, CH)

Swing-Out Rotor TST60.4 (Kontron, Zürich, CH)

Inkubatoren: CO₂-begasbarer Brutschrank für Zellkultur IR-Outflow
(Nuair über Zapf, Sarstedt)

Brutschrank für Bakterienkultur B5060E (Heraeus, Hanau)

Schüttelinkubator Modell HT (Infors, Bottmingen, CH)

Netzgeräte: Modell E455 (Consort über Fröbel, Wasserburg)

Modell E434 (Consort über Fröbel, Wasserburg)

Modell ECPS 3000/150 (Pharmacia, Freiburg)

Photometer: UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Überlingen)

VMAX kinetic microplate reader (Molecular Devices, München)

Wasserbäder: Modell U3 und SW-20C (Julabo Labortechnik, Seelbach)

Modell SW-20C (Julabo Labortechnik, Seelbach)

Pharmacia LKB Multi Temp II (Pharmacia, Freiburg)

Schüttler: Vortex VF2 (Bender und Hobein AG, Zürich, CH)

Rocky (Uni Equip Laborgerätebedarf, München)

IKA-Schüttler MTS2 (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik,
Staufen i. Br.)

Heizblöcke: Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)

Mikroskope: Axiophot (Zeiss, Oberkochen)

Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen)

	Mikrodissektionsmikroskop Stemi SV6 (Zeiss, Oberkochen)
	Wilovert S (Hund, Wetzlar)
Waagen:	Feinwaage MCI Research RC210D (Sartorius, Göttingen)
	Laborwaage MCI Laboratory LC4800P (Sartorius, Göttingen)
Sonstiges:	Autoklav Varioklav Typ 300 (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
	Flachbettgelkammer EasiCast Midi (MWG-Biotech, Ebersberg)
	Heizrührer Ikamag RCT (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Br.)
	Homogenisator Ultra-Turrax T8 (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Br)
	Kryostat Microtom, HM 500 OM (Leitz, Wetzlar)
	Liquid Scintillation Analyzer 1600TR (Canberra Packard, Frankfurt/M)
	Luminometer Microlumat LB96P (Berthold, Bad Wildbad)
	Mini PROTEAN II Elektrophorese System (BioRad, München)
	Nucleinsäure-Sequenziergerät 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems, Weiterstadt)
	pH-Meßgerät 192 (WTW, Weilheim)
	Pipetten (Abimed, Langenfeld; Eppendorf, Hamburg)
	PCR-Maschine, RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
	Sterilbank Class II, Typ A/B3 (Nuaire über Zapf, Sarstedt)
	Stickstofftank Chronos Biosafe (Messer Griesheim, Frankfurt)
	UV-Lichttisch 312 nm (Bachofer, Reutlingen)
	UV-Lichttisch 254 nm (Bachofer, Reutlingen)
	Video-Bildverarbeitungssystem (Appligene, Pleasanton, CA, USA)
	Wasserfiltrations- und Deionisierungsanlage (Seral, Ransbach-Baumbach)
	Zellzählgerät (Casy-1, Schärfe-System, Reutlingen)

II.2 Verbrauchsmaterialien

II.2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. bezogen, sofern im Text nicht näher bezeichnet: Difco/Augsburg, Gibco BRL/Eggenstein, J.T. Baker/Griesheim, Fluka/Buchs (CH), Merck/Darmstadt, Riedel-de Haen/Seelze, Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg, Sigma/Deisenhofen.

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Clontech/Heidelberg, Eurogentech/Seraing (B), Gibco BRL/Eggenstein, New England Biolabs/Bad Schwalbach und MBI-Fermentas/St. Leon-Rot bezogen.

Folgende modifizierende Enzyme wurden verwendet:

Shrimps Alkaline Phosphatase	USB (Fa. Amersham/Braunschweig)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
RNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Boehringer Mannheim
DNase I , RNase frei	Pharmacia
DNase I	Boehringer Mannheim
T4-DNA Ligase	Boehringer Mannheim
T4-DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

II.2.2 Verwendete Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung von Zellen (siehe II.13.10) und Geweben (siehe II.12.2 und II.12.3) sowie für Western Blot Analysen (siehe II.9.2/3) wurden die folgenden Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

Spezies-Antigen-Kopplung	Bezeichnung/Klon	Referenz/Hersteller	IHC/IF	WB
goat- α -Avidin D		Vector Laboratories	1:75	1:500
rat- α -mPECAM-1	Mec13.3	E. Dejana, Mailand (Vecchi et al., 1994)	unverd. ÜS	-
rat- α -mVEGFR-1		H.Weich	-	1:6000
rat- α -mVEGFR-2	12 β 11	(Kataoka et al., 1997)	unverd. ÜS	
α -Flag M2		Sigma (Deisenhofen)	-	1:1000
rb- α -HRP		Dianova (Hamburg)	1:400/1:600	-

Tab. II.1 Übersicht der verwendeten Primärantikörper

(goat) Ziege, (HRP) Meerettich Peroxidase, (IHC) Immunhistochemie, (IF) Immunfluoreszenz, (m) Maus, rat (Ratte), (rb) Kaninchen, (unverd.) unverdünnt, (ÜS) Kulturüberstand, (WB) Western Blot

Spezies-Antigen-Kopplung	Konjugation	Referenz/Hersteller	IF	WB
ch- α -rb IgG (H+L)	Alexa Fluor [®] 594	Molecular Probes	1:500/1:1000	-
goat- α -rat IgG (H+L)	Alexa Fluor [®] 594	Molecular Probes	1:500	-
goat- α -rat IgG (H+L)	Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes	1:500	-
rb- α -goat IgG (H+L)	Alexa Fluor [®] 594	Molecular Probes	1:500	-
rb- α -goat IgG (H+L)	Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes	1:500	-
goat- α -m IgG (H+L)	HRP	Jackson ImmunoResearch	-	1:10000
rb- α -goat IgG (H+L)	HRP	Jackson ImmunoResearch	-	1:2000
rb- α -goat IgG (H+L)	HRP	DAKO, Hamburg	-	1:2000

Tab. II.2 Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

(goat) Ziege, (HRP) Meerettich Peroxidase, (IF) Immunfluoreszenz, (m) Maus, rat (Ratte), (rb) Kaninchen, (WB) Western Blot

II.2.3 Sonstiges

DNA-Größenmarker: 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL)

Protein-Größenmarker: Prestained SDS-PAGE Standard, 'High Range' (BioRad)

Reaktionsgefäße, 0.2-2.0 ml (Eppendorf)

15 ml bzw. 50 ml Zentrifugengefäße (Falcon/Becton-Dickinson)

Gewebekulturgefäße (Costar, Greiner, Nunc)

Pipettenspitzen (Greiner)

Sterilfilter (Schleicher und Schuell, Pall Filtron)

Hyperfilm ECL (Amersham Life Science)

Röntgenfilm Xomat (Kodak)

Nitrocellulose Transfer Membran Protran BA 83 (Schleicher und Schuell)

PVDF Transfer Membran (Schleicher und Schuell)

II.3 Häufig verwendete Lösungen

Für die Experimente der Molekularbiologie wurden generell Chemikalien der Hersteller Difco/Detroit (USA), Gibco BRL/Eggenstein, Merck/Darmstadt, Riedel de Haen/Seelze und Sigma/Deisenhofen eingesetzt. Dabei wurden die Standardlösungen in deionisiertem, ultrafiltriertem und autoklaviertem Wasser nach Ausubel et al. (1987-1997) oder Sambrook et al. (1989) angesetzt.

1 x TAE (Tris-Azetat-EDTA)

40 mM Tris-Azetat

1 mM EDTA

6 x Probenpuffer (DNA)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenzanol 40% (w/v) Saccharose 10 mM EDTA
1 x TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
10/0.1 TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1 mM EDTA
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCL 43 mM Na ₂ HPO ₄ 14 mM KH ₂ PO ₄

II.4 Verwendet Plasmide

Nummer	Name	Verwendung/Beschreibung	Referenz
1	pKSII(+)	Klonierungsvektor	Stratagene
2	pLScARNL	Original Scavidin Plasmid	(Lehtolainen et al., 2002)
3	pHTT631	Original Lodavin Plasmid	S. Ylä-Herrtuala
4	pKS-Scavidin	<i>PstI</i> -Fragment aus #2 in #1	diese Arbeit
5	pKS-Lodavin	<i>BamHI</i> -Fragment aus #3 in #1	diese Arbeit
6	pFlk-1-LacZ5	LacZ unter <i>flk-1</i> Promotor (bp -642/+299) und Enhancer (bp +1677/+3947) in antisense-Orientierung	(Kappel et al., 1999)
7	pFlk-1-MCS	MCS in <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Schnittstelle von #6	diese Arbeit
8	pFlk-1-Scavidin	<i>HindIII</i> / <i>NotI</i> -Fragment aus #4 in #7	diese Arbeit
9	pFlk-1-Lodavin	<i>HindIII</i> / <i>NotI</i> -Fragment aus #5 in #7	diese Arbeit
10	pLXSN	retroviraler Expressionsvektor	BD Bioscience
11	pLXSN-Scavidin	<i>XhoI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment aus #4 in #10	diese Arbeit
12	pLXSN-Lodavin	<i>BamHI</i> -Fragment aus #5 in #10	diese Arbeit
13	rtTA _{PHD12#3}	retroviraler Vektor basierend auf rtTA System	H. Drexler
14	prtTA-Scavidin	<i>EcoRI</i> -blunt-end-Fragment aus #4 in <i>SmaI</i> / <i>HincII</i> -Schnittstelle von #13	diese Arbeit
15	prtTA-Lodavin	<i>EcoRI</i> -blunt-end-Fragment aus #5 in <i>BamHI</i> -blunt-end-Schnittstelle von #13	diese Arbeit

Nummer	Name	Verwendung/Beschreibung	Referenz
16	pMFG-DBC	Deletionsmutante dnEts-1	(Mattot et al., 2000)
17	pKS-dnEts-1 Flag	unter Verwendung von mEts-1-FW1 + dnEts-1+Flag-REV amplifiziertes und <i>XhoI</i> verdautes PCR-Fragment aus #16 in #1	diese Arbeit
18	pLXSN-dnEts-1 Flag	<i>XhoI/BamHI</i> -Fragment aus #17 in #10	diese Arbeit
19	pcDNA3-HIF2dnFlag	dnHIF2 α -FLAG unter CMV promotor	(Elvert et al., 2003)
20	pLXSN-dnHIF2 α	<i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus #19 in #10	diese Arbeit
21	pcDNA3	Expressionvektor	Invitrogen
22	pFlk-1-Luc	Luciferase unter Flk-1 promotor/enhancer	(Ronicke et al., 1996)
23	pCMV-LacZ	LacZ unter CMV promotor	(Andersson et al., 1989)
24	pCMV-Ets-1	Ets-1 unter CMV promotor	(Wasylyk et al., 1991)
25	pCMV-HIF2 α	HIF2 α -FLAG unter CMV promotor	(Kappel et al., 1999)

II.5 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten 2'Desoxyoligoribonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Oligonukleotid	Basensequenz (5'>3')	Verwendung	Temp
5'Oligo-MCS	AGCTTATCGATGATATCGCGGCCGC GCTAGCCTCGAGGGGCCCG	Insertion einer MCS in <i>HindIII/EcoRI</i> -Schnittstelle von Plasmid #6	-
3'Oligo-MCS	AATTCGGGCCCCCTCGAGGCTAGCG CGGCCGCGATATCATCGATA	Insertion einer MCS in <i>HindIII/EcoRI</i> -Schnittstelle von Plasmid #6	-
Scav REV4	AAATCAAGTACTGTGGTGTTC	Genotypisierung von Scavidin	60°C
ScavII REV1	CTTGGGCGAGTGGGGTTGAT	Genotypisierung von Lodavin	60°C
Flk1-FW1	GCAGCCGGGATAACCTGGC	Genotypisierung von Scavidin und Lodavin	60°C
SI-FW2	TTGTAGTTCTCGTGCCCATCATTG	RT-PCR von Scavidin	57°C
SI-REV2	ATTTCCCCTTTTATTTCTGTTC	RT-PCR von Scavidin	57°C

Oligonukleotid	Basensequenz (5'>3')	Verwendung	Temp
SII-FW1	GGG GGC CTG AAT GGT GTG GA	RT-PCR von Lodavin	59°C
SII-REV1	CTT GGG CGA GTG GGG GTT GAT	RT-PCR von Lodavin	59°C
GAPDH forw	CAGTATGACTCCACTCACGGC	RT-PCR von GAPDH	56°C
GAPDH rev	GAGGGGCCATCCACAGTCTTC	RT-PCR von GAPDH	56°C
mEts-1 FW	ATCTCGAGACCATGGACTATGTGCG TGACCGTG	Zur Klonierung des FLAG-Epitops von dnEts-1 (Plasmid #16) RT-PCR von Ets-1	56°C
mEts-1-Flag REV	AAGCGGCCGCTCATTATCGTCATC GTCCTTGTAGTCGTATCCCAGCAGG CTCTGCAGG	Zur Klonierung des FLAG-Epitops von dnEts-1 (Plasmid #16) RT-PCR von Ets-1	56°C
dnEts-1 FW-PCR	AGTCTTGTCAGTCCTTTATCAGC	RT-PCR von dnEts-1	56°C
dnEts-1 REV PCR	TTTATCGTCATCGTCCTTGTAG	RT-PCR von dnEts-1	56°C
HIF2 α dom neg FW	AGGCCGACCAGCAAATGGA	RT-PCR von HIF2 α	56°C
HIF2 dom neg REV	GAGTGAAGTCAAAGATGCTGTGTC	RT-PCR von HIF2 α	56°C

Tab. II.3 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

(GAPDH) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, (Temp) Annealingtemperatur, (MCS) „multiple-cloning-site“

II.6 Bakterien

II.6.1 Verwendete Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde zur Vermehrung rekombinanter DNA in Form von Plasmid-Vektoren eingesetzt. Dabei wurde folgender der Bakterienstamm DH5 α verwendet (supE44, hsdR17, recA1, Δ lacU169, ϕ 80lacZDM15, endA1, gyrA96, thi-1, relA1).

II.6.2 Bakterien Medien

LB-Medium: 20 g LB-Broth (Gibco BRL/Eggenstein)
auf 1L mit H₂O auffüllen

LB-Agar: 1L LB-Medium
15 g Bacto-Agar (Difco/Augsburg)

Antibiotikum: Ampizillin (Boehringer Mannheim)
Stammlösung: 100 mg/ml in sterilem Wasser
Endkonzentration: 50-100 μ g/ml

Die Medien wurden mit ultrafiltriertem Wasser (Anlage der Fa. Seral/Ransbach-Baumbach) angesetzt und anschließend autoklaviert. Das Antibiotikum wurde nach dem Lösen sterilfiltriert, in Aliquots bei -20°C aufbewahrt und dem Medium bei Bedarf zugesetzt.

II.6.3 Lagerung und Vermehrung

Zur Vermehrung der Bakterien wurde eine einzelne Kolonie von einer LB-Agar-Platte in einem Volumen von 2-3 ml LB-Medium überimpft und im Bakterienschüttler bei 240 rpm, 37°C 8-12 Stunden inkubiert. Zum weiteren Wachstum wurde die Vorkultur in einen Erlenmeyer-Kolben mit dem gewünschten Volumen LB-Medium überführt und über Nacht auf die gleiche Weise inkubiert.

Zur Langzeitlagerung von Bakterienstämmen und transformierten Bakterien wurden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase 750 µl der Kultur mit dem gleichen Volumen einer sterilen Glycerol-Stock-Lösung versetzt, auf Eis heruntergekühlt und sofort bei -80°C eingefroren. Zur erneuten Kultivierung wurden Teile der tiefgefrorenen Kultur mit einer Impföse von der Oberfläche abgenommen und auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen.

Glycerol-Stock-Lösung:	40% (v/v) Glycerol
	0,1 M (w/v) CaCl ₂
	0,1 M (w/v) MgCl ₂

II.6.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde eine Übernacht-Kultur in LB-Medium angeimpft, aus der am nächsten Morgen 1 ml auf 100 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und bis zu einer OD_{600nm} 0,6 im Bakterienschüttler inkubiert wurde. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien bei 2500 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde vorsichtig in 7,5 ml TSB resuspendiert und die Suspension eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien entweder sofort für eine Plasmidtransformation verwendet oder aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TSB:	5% (v/v) DMSO
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄

10% (w/v) PEG 6000
in 2x LB-Medium
2x LB: 20 g Trypton
10 g Hefeextrakt
20 g NaCl
mit H₂O auf 1 l auffüllen, den pH-Wert auf 7,0 einstellen und
autoklavieren

II.6.5 Chemische Transformation von Bakterien

Das Plasmid oder der Ligationsansatz wurde mit 20 µl 5x KCM versetzt, mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht und auf Eis abgekühlt. Die bei -80°C gelagerten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit der vorgekühlten DNA-Lösung gemischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei RT. Die nachfolgende Inkubation in 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium für 30-45 min bei 37°C im Schüttelinkubator ermöglichte den transformierten Bakterien die Expression des Antibiotikum-Resistenzgens. Danach wurden die Bakterien auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen, die zur Selektion Ampizillin enthielt.

5x KCM: 500 mM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

II.7 DNA

II.7.1 Isolation von DNA

II.7.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmide von Bakterienkulturen wurden über analytische Plasmid-DNA-Präparationen gewonnen, die eine DNA-Menge von ungefähr 5 µg für ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl lieferten. Hierzu wurden generell die Puffer und Reaktionsprotokolle der Firma Qiagen/Hilden verwendet. Die Bakterien einer 2-3 ml Übernacht-Kultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 4000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 0,2 ml Puffer 1 (4°C) resuspendiert und mit 0,2 ml Puffer 2 (RT) gemischt. Nach Zugabe von 0,2 ml Puffer 3 (4°C) und erneutem Durchmischen wurde die Lösung für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Tischzentrifuge, RT, 10 min, 12000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Für anschließende Restriktionsanalysen wurden 5 µl der DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Für Transfektionen von eukaryontischen Zellen erfolgte die DNA-Präparation nach dem Plasmid-Maxi-Kit Protokoll der Firma Qiagen/Hilden. Generell wurden für die quantitative Plasmid-Isolierung 100 ml einer Übernacht-Bakterien-Kultur eingesetzt. Die DNA Reinigung erfolgte nach dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Prinzip, wobei sich an die Neutralisation eine Ionenaustausch-Chromatographie nach dem mitgelieferten Protokoll anschloß (Maxi-Säule; Qiagen/Hilden). Je nach Pelletgröße wurde die präparierte und trockene DNA in 200-500 µl ddH₂O aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt (siehe II.7.5) und bei -20°C gelagert.

Resuspensionspuffer P1 (Qiagen/Hilden):	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A
Lysepuffer P2 (Qiagen/Hilden):	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Neutralisationspuffer P3 (Qiagen/Hilden):	3 M Kaliumazetat, pH 5,5

II.7.1.2 Isolation genomischer DNA aus Gewebe

Das Gewebe (Dottersack bzw. Schwanzspitze) wurde in 100 bzw. 500 µl Lysis-Puffer aufgenommen, mit 1 bzw. 5 µl Proteinase K versetzt und mehrere Stunden bei 56°C geschüttelt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 20 min bei 96°C inkubiert, anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Analyse der genomischen DNA wurde 1 µl des Reaktionsansatzes für die PCR eingesetzt (siehe II.7.9).

Lysepuffer	50 mM KCL 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 0,45% NP-40 0,45% Tween 20 100 µg/ml Proteinase K (frisch zusetzen)
------------	--

II.7.2 Reinigung von DNA

II.7.2.1 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung diente der Konzentrierung von wässrigen DNA-Lösungen sowie der Entfernung von Salzen und Resten organischer Lösungsmittel. Hierzu wurde die DNA mit 0,1 Volumen Natriumacetat pH 7,0 und 2,5 Volumen Ethanol oder 1 Volumen Isopropanol vermischt, für mehrere Stunden bei -20°C inkubiert und für 30 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in der gewünschten Menge 10/0,1 TE aufgenommen.

II.7.2.2 Kieselgel-Adsorptionschromatographie

Bei hohen Salzkonzentrationen adsorbieren Nukleinsäuren an eine stationäre Matrix aus Kieselsäure. Die Elution erfolgt daher durch einen Niedrigsalzpuffer. Auf diesem Prinzip beruhen die QIAquick Spin-Säulen (Qiagen/Hilden), die zur Reinigung kleiner Mengen (bis 10 µg) DNA bis 10 kbp dienen. Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers gereinigt und in Wasser eluiert.

II.7.2.3 Anionen-Austauschchromatographie

Eine Anionen-Austauschchromatographie wurde verwendet, um DNA von höchstem Reinheitsgrad herzustellen. Bei einem pH < 7,0 sowie niedrigen Salzkonzentrationen bindet die DNA an eine entsprechende stationäre Matrix, von der sie durch eine Erhöhung der Salzkonzentration eluiert werden kann. Dabei wurden die Säulen der Firma Qiagen vom Typ Tip-100 und Tip-500 nach Angaben des Herstellers verwendet. Die eluierte wässrige DNA-Lösung wurde durch eine Alkoholfällung mit Isopropanol und anschließender Ethanolwaschung von kontaminierenden Salzen befreit.

II.7.3 Gelelektrophoretische Separation von DNA-Fragmenten

Die Größenfraktionierung von Nukleinsäuren erfolgte in einer horizontalen Gelmatrix aus Agarose. Die aufgrund von Phosphatresten negativ geladene DNA wandert nach Anlegen eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Eine Trennung ergibt sich aus der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe. Die jeweilige Laufstrecke ist dem dekadischen Logarithmus der Anzahl der im DNA-Molekül enthaltenen Nukleotide direkt proportional. Somit konnten die einzelnen DNA-Fragmente nicht nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt, sondern auch ihre Länge mittels eines Größenmarkers bestimmt werden. Durch Färben der DNA mit der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid konnten die einzelnen DNA-Fragmente

bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Elektrophorese- und Agarosegelpuffer wurde 0,5xTAE verwendet. Der Agaroselösung wurde nach dem Erhitzen 3,5 µg Ethidiumbromid pro 100 ml zugesetzt. Generell wurden für DNA-Fragmente mit einer Größe von ungefähr 4 kbp Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% (w/v) und für DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 4 kbp Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 bis 2% verwendet. Die Agarose-Lösung wurde in eine Flachbettgelkammer gegossen und ein Kamm, der die späteren Taschen des Gels markierte, eingefügt. Nach dem Erstarren der Gelmatrix wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet, der Kamm entfernt und die DNA in Probenpuffer in die Taschen pipettiert. Die Gele wurden bei einer Spannung von 10 V/cm gefahren und als Größenstandard ein kommerziell erhältlicher 1 kbp Marker der Firma Gibco BRL/Eggenstein eingesetzt. Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden bei 254 nm visualisiert und mittels eines Video-Bildverarbeitungssystems dokumentiert.

II.7.4 Gelelution

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die gewünschten DNA-Fragmente auf zweierlei Arten aus Agarosegelen eluiert. In beiden Fällen wurden die Banden auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 kbp wurden dann mit dem QIAquick Gel-Extraction-Kit (Qiagen/Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Nach der Reinigung wurde ein Fünftel der eluierten DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, um die DNA-Konzentration abschätzen zu können. Die Reinigung linearisierter Injektionsfragmente zur Oozyteninjektion für die Herstellung transgener (siehe II.10.1) Mäuse erfolgte mittels QIAEX II Gel-Extraction-kit (150) der Firma Qiagen/Hilden nach Anweisungen des Herstellers. Die gefällte DNA wurde zuletzt gewaschen, in 10/0,1 TE aufgenommen, quantifiziert und auf einem Agarosegel überprüft.

II.7.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Die Absorption bei 260 nm gibt den Gehalt an Nukleinsäuren (aromatische Ringe von Purinen und Pyrimidinen) in der Lösung an, während bei 280 nm vornehmlich der Proteinanteil (aromatische Ringe in den Seitenketten) gemessen wird. Somit ist der Quotient aus der

Absorption bei diesen Wellenlängen ein Maß für die Reinheit der DNA-Präparation. Der Quotient 260 nm/280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wobei die Nukleinsäurekonzentration einer wässrigen Lösung laut Literatur bei OD=1,0 ist.

Nukleinsäure	$\mu\text{g/ml}/\text{OD}_{260\text{nm}}$
DNA, doppelsträngig	50
DNA, einzelsträngig	ca. 30
RNA	40

Tab. II.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

II.7.6 Enzymatische Modifikation von DNA

II.7.6.1 Restriktionsverdau

Für analytische Restriktionsansätze wurden 20 μl , für quantitative Restriktionsspaltungen 50 bis 100 μl Reaktionsvolumina eingesetzt. Die verwendeten Plasmidkonzentrationen wurden so gewählt, dass bei analytischen Restriktionsanalysen das gesuchte Fragment in einer Konzentration von mindestens 200 ng vorlag; bei quantitativen Restriktionsspaltungen mit anschließender Gelelution betrug die Konzentration des benötigten Fragments mindestens 500 ng. Die Spaltung der DNA erfolgte durch 5-10 Einheiten Enzym für 1-3 h bei den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen, meist aber bei 37°C im Inkubator. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumen 6x Probenpuffer gestoppt und die Auftrennung der Restriktionsfragmente mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Bei Mehrfachspaltungen mit Enzymen, die unterschiedliche Pufferpräferenzen besaßen, wurde die DNA zwischen den einzelnen Spaltungen mittels Kieselgel-Adsorptionschromatographie (QIAquick Spin-Säulen, Qiagen/Hilden) gereinigt (siehe II.7.2.2). Ein Aliquot des Restriktionsansatzes wurde mit 6x Probenpuffer versetzt, um in einem Agarosegel die Qualität und Vollständigkeit der DNA-Spaltung zu überprüfen.

II.7.6.2 Konversion von 5'-Überhängen

Sollte nach der Restriktion eine Verknüpfung zwischen zwei DNA-Molekülen hergestellt werden, die nicht-kompatible Enden aufwiesen, wurden 5'-Überhänge durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment der bakteriellen DNA-Polymerase I aufgefüllt (blunt-end Klonierung). Die Reaktion erfolgte im Restriktionspuffer in Anwesenheit eines Desoxynukleotidtriphosphat-Gemischs (Enkonzentration 20 μM aller vier dNTPs) und 1-

2 Einheiten des Klenow-Fragments für 15-30 min bei RT und wurde durch 15 minütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

II.7.6.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Effizienz intermolekularer Ligationen zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatreste von Vektor-DNA mit kompatiblen Enden entfernt. Hierzu wurde die verdaute Vektor-DNA nach Aufreinigung aus dem Agarosegel in einem Volumen von 50 µl mit 1 µl Shrimps Alkaline Phosphatase im mitgelieferten Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 65°C inaktiviert.

II.7.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von kompatiblen Enden erfolgte durch eine Inkubation mit der T4-DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen I. Hierzu wurden 100 ng Vektor-DNA mit einem 5-fachen (zur Ligation von DNA-Fragmenten mit Basenüberhängen) bzw. 20-fachen (zur Ligation von DNA-Fragmenten ohne Basenüberhänge) molaren Überschuß des einzusetzenden Fragments zusammen mit 1 Einheit T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Reaktion erfolgte im mitgelieferten Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

II.7.7 Hybridisierung kurzer DNA-Fragmente

Zur Generierung und Insertion einer „multiple-cloning-site“ (MCS) in einen Vektor müssen die MCS enthaltenen komplementären Oligonukleotide zunächst hybridisiert werden. Hierzu wurden je 50 ng beider Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit H₂O gelöst und für 2 min auf 95°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam innerhalb mehrerer Stunden auf RT abgekühlt. Da die komplementären Oligonukleotide mit überhängenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen synthetisiert wurden, konnte das hybridisierte Fragment direkt für die Insertion in den Vektor verwendet werden (siehe II.7.6.4).

II.7.8 Sequenzierung von DNA

(nach Sanger et al., 1977)

Die DNA-Sequenzierungen wurde durch nicht-radioaktive Markierung mit einem automatischen Sequenzierapparat (373A, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierungs-Reaktionen wurden im Max-Planck-Institut durch Carola Wild, Sandra

Heinz, Rita Mittnacht-Kraus, Monika Euler und Silvia Henning mit Geräten und nach den Protokollen der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

II.7.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(modifiziert nach Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basiert auf der exponentiellen Amplifikation von DNA-Molekülen mittels spezifischer Oligonukleotidprimer und einer thermostabilen DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Hierbei wird der Matrizen-DNA-Doppelstrang zusammen mit den spezifischen Primern bei 95°C denaturiert und dann auf eine Temperatur abgekühlt, die bei der kalkulierten Schmelztemperatur der Primer liegt („Annealingtemperatur“). Bei diesem Schritt können die Primer an die komplementären Sequenzen der nun einzelsträngigen Matrize binden. Als nächster Schritt folgt eine Inkubation bei 72°C, was der thermostabilen DNA-Polymerase eine Synthese der zur Matrize komplementären Sequenzen von den Primern ausgehend ermöglicht. Diese Temperaturabfolge wird mehrfach wiederholt und führt bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der vorliegenden DNA-Moleküle.

Die PCR wurde generell in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Einzige Ausnahme war die Amplifizierung des dnEts-1 zu Klonierungszwecken; hierbei wurde die Reaktion in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. 1 µl der DNA-Probe wurde in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß mit 19 µl des Reaktionsmixes (2 µl 10 x PCR-Puffer (Promega); 1,2 µl 25 mM MgCl₂; 0,8 µl 5 mM dNTPs; je 0,13 µl 100 µM Primer 1 und Primer 2; 0,2 µl Taq-Polymerase (Promega); ddH₂O *ad* 20 µl) gemischt. Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine (Robocycler, Stratagene, Heidelberg) mit den folgenden Zyklen durchgeführt:

Genotypisierung: Lodavin und Scavidin

5 min 94°C

30 sek 94°C

45 sek 60°C

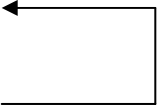
45 sek 72°C

6 min 72°C



RT-PCR: Lodavin und Scavidin


5 min 94°C
30 sek 94°C
45 sek 58°C
45 sek 72°C
4 min 72°C



35x

Klonierung dnEts-1


5 min 94°C
45 sek 94°C
45 sek 55°C
45 sek 72°C
8 min 72°C



35x

RT-PCR GAPDH

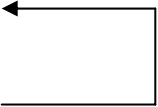
5 min 94°C
30 sek 94°C
45 sek 56°C
45 sek 72°C
4 min 72°C



30x

RT-PCR: Ets-1, dnEts-1, HIF2 α und dnHIF2 α

5 min 94°C
30 sek 94°C
45 sek 56°C
45 sek 72°C
4 min 72°C



35x

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 6x Probenpuffer versetzt und auf einem Agarosegel analysiert.

II.8 RNA

II.8.1 Reinigung und Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen oder Gewebe erfolgte mittels RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen/Hilden. Hierzu wurden die Zellen auf 35 mm-Schalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einmaligen waschen mit PBS wurden sie in 350 µl Lysepuffer mit einem Zellschaber von der Kulturschale entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Homogenisierung wurde das Lysat mehrere male durch eine 25G Nadel gezogen. Zur Isolierung von RNA aus Maus-Embryonen oder Tumoren wurde das Gewebe entnommen (siehe II.10.4. und II.10.5), gewogen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 350-600 µl Lysepuffer wurde das Material mittels eines Stampfers homogenisiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde zur Entfernung von kontaminierender DNA eine DNase-Behandlung auf der Säule mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen/Hilden) durchgeführt. Die RNA wurde in 30-40 µl ddH₂O von der Säule eluiert, die Konzentration bestimmt (siehe II.7.5) und bei -80°C aufbewahrt.

II.8.2 Reverse Transkription (RT) von RNA

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-Sequenz in eine cDNA-Sequenz übertragen, welche dann durch PCR (siehe II.7.9) mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert werden kann. Um von jeder Probe die gleiche Menge RNA in die Reverse Transkription einzusetzen (semiquantitative RT-PCR) wurde zunächst die Gesamt-RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe II.7.5.). 2 µg dieser isolierten RNA zusammen mit ddH₂O des 20 µl-RT-Reaktionsansatzes wurden für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription erfolgte schließlich für eine Stunde bei 37°C im Inkubator. Parallel wurde zur Kontrolle von Kontaminationen genomischer DNA eine Inkubation der RNA im Reaktionsgemisch ohne Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt.

20 µl-RT-Ansatz:	2 µg Gesamt-RNA
	10 mM DTT (Sigma, Deisenhofen)
	0,5 mM dNTPs (Pharmacia, Freiburg)
	1 µg Oligo (dT) ₁₅ Primer (Promega, Madison, USA)
	20 Einheiten RNasin (Promega, Madison, USA)
	200 Einheiten SuperScriptII Reverse Transkriptase

(Gibco BRL, Eggenstein)

1 x „First strand buffer“ (Gibco BRL, Eggenstein)

Anschließend wurde das RT-Reaktionsgemisch 1:4 verdünnt und 1 µl davon zur PCR-Amplifikation mittels spezifischer Oligonukleotide der zu untersuchenden cDNA eingesetzt. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit Primern für ein "Haushaltsgen" durchgeführt. In diesem Falle wurden Primer für die murine GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

II.9 Proteinbiochemie

Für die Experimente der Proteinbiochemie wurden generell Chemikalien der Firmen Amersham/Braunschweig, BioRad/München, Fluka/Neu-Ulm, Pierce/Sankt Augustin, Riedel-de Haen/Seelze, Roth/Karlsruhe, Sigma/Deisenhofen und Merck/Darmstadt eingesetzt.

II.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(modifiziert nach Laemmli, 1970)

Proteine wurden mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS werden die Proteine denaturiert, wodurch konformative Effekte bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine weitgehend ausgeschaltet werden. Gleichzeitig erhalten die Proteine durch die Komplexierung mit SDS eine negative Überschußladung, so dass die Auftrennung unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung nur nach dem Molekulargewicht erfolgt. Das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert zudem inter- und intramolekulare Disulfidbrücken. Je nach Molekulargewichtsbereich der untersuchten Proteine wurden unterschiedliche Anteile an Acrylamid (siehe Tab. II.5) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in 0,75 mm dicken Minigelen (Protean II; BioRad). Die vorbereiteten Proben in einfach konzentriertem Proteinprobenpuffer wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt, 2 min bei Raumtemperatur maximal abzentrifugiert und dann in die zuvor ausgespülten Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden Proteine definierter Größe verwendet, an die zur Visualisierung ein Farbstoff kovalent gebunden war (Prestained SDS-PAGE-Standard, high and low range; BioRad). Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V/Gel für ca. 120 min.

Lösungen	Trenngel				Sammelgel
Acrylamidanteil [%]	7,5	10	12,5	15	5
30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bisacrylamid [ml]	1,5	2	2,5	3	0,33
1,88 M Tris-HCl, pH 8,8 [ml]	1,2	1,2	1,2	1,2	
0,625 M Tris-HCl, pH 6,8 [ml]					0,4
0,5 % SDS [ml]	1,2	1,2	1,2	1,2	0,4
ddH ₂ O [ml]	2,1	1,6	1,2	0,5	0,87
TEMED [μ l]	5	5	5	5	2
10 % (w/v) APS [μ l]	30	30	30	30	10

Tab. II.5 Reagenzien für ein 0,75 mm Gel

4 x Proteinprobenpuffer:	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 34,8% (v/v) Glycerin 0,04% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
Laufpuffer:	25 mM Tris-Base (USB, Freiburg) 192 mM Glycin (Riedel de Haen, Seelze) 0,1% (w/v) SDS (Sigma, Deisenhofen)
„Prestained Marker“:	unverdünnt ca. 6 μ l pro Tasche auftragen

II.9.2 Western Blot

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine mit einem als „Semidry-Blot“ bezeichneten Verfahren auf eine Nitrozellulose- bzw. PVDF Membran (Porengröße 0,2 mm) übertragen. Hierzu wurden ein Membranfilter und sechs Whatman 3MM Filter (Schleicher und Schuell) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Semy-Dry-Blotting Puffer getränkt. Zwischen zwei Graphitelektroden wurden beginnend auf der Anodenseite der Blotapparatur 3 x Whatman-Papier, die Membran, das Proteingel und nochmals 3 x Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 2,5 mA/cm². Anschließend wurde die Membran kurz in PBST gewaschen und noch feucht zur immunochemischen Detektion eingesetzt.

Blotpuffer	48 mM Tris-HCl pH 8,3 39 mM Glycin 0,038% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
------------	---

PBST 1x PBS
 0,1% (v/v) Tween-20

II.9.3 Immunochemische Detektion immobilisierter Proteine

Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation über Nacht bei 4°C in 3% BSA bzw. 5% Magermilchpulver in PBST unter Schütteln abgesättigt. Anschließend wurde die Membran einmal kurz in PBST gewaschen. Das spezifische Antiserum wurde in geeigneter Verdünnung in 3% BSA/PBST angesetzt (siehe Tab II.1) und für 1 h bei RT unter Schütteln mit der Membran inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit PBST für je 10 min unter Schütteln entfernt. Die Membran wurde anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem, gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichteten Zweitantikörper in geeigneter Verdünnung in 3% BSA/PBST bzw. 5% Magermilchpulver/PBST für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert (siehe Tab. II.2). Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBST und dreimal mit PBS gewaschen, um das Detergenz vollständig zu entfernen. Die Detektion erfolgte schließlich mit dem "Enhanced chemiluminescence"-System (ECL, Amersham) nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wird durch die Peroxidase mit Hilfe von Wasserstoffperoxid eine Chemilumineszenz von Luminol ausgelöst. Diese Lichtemission wurde durch Exposition der Nitrozellulosemembran auf einem Röntgenfilm detektiert.

II.10 Transgene Mäuse

(nach Palmiter et al., 1982 und Hogan et al., 1994)

Durch Mikroinjektion kann fremde linearisierte DNA in einen der Pronukleoli einer befruchteten Mausoozyte gebracht werden und in das Genom an zufälligen Stellen integrieren. Wird die Oozyte anschließend in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Maus transferiert, kann sich ein transgenes Tier entwickeln, welches zu einem bestimmten Anteil aus Zellen besteht, die die fremde DNA in ihrem Genom integriert haben. Dabei kann der Ort der Integration sowie die Anzahl der integrierten DNA-Kopien nicht beeinflusst werden. Durch Kreuzung kann das Transgen an Nachkommen weitergegeben werden, welche dann heterozygot für das Transgen sind. Die Generierung der in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Mäuse erfolgte als Serviceleistung des Institutes und wurde von N. Rink und F. Müller-Holtkamp durchgeführt.

II.10.1 Etablierung und Haltung transgener Mäuse

Tiere der F₁-Generation des Hybridstamms C57BL/6 x C3H/He wurden zur Gewinnung von befruchteten Oozyten herangezogen und als pseudoträchtige Weibchen eingesetzt. Pseudoträchtige Weibchen wurden aus Verpaarungen mit vasktomierten NMRI-Albino Männchen gewonnen. Die Tiere stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden über die unten aufgeführten Firmen bezogen. Die Tiere wurden in einem separaten Tierstall bei einer Raumtemperatur von 22°C und 55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl befruchteter Mausoozyten wurden 21-28 Tage alte C57BL/6 x C3H/He-Weibchen zur Superovulation stimuliert. Dies erfolgte durch Injektion von PMS (FSH- Stimulation) und hCG (LH-Stimulation). Anschließend wurden zwei Weibchen mit einem vasktomierten Männchen verpaart. Die Männchen und die pseudoträchtigen Weibchen hatten ein Alter von mindestens 8 Wochen, die superovulierten Weibchen waren jünger. Nach Verpaarung der superovulierten Weibchen mußten die befruchteten Oozyten zur Mikroinjektion aus dem Eileiter isoliert werden. Nachdem die Oozyten gereinigt worden waren, wurden sie unter einem Mikroskop durch leichten Unterdruck mit einer Haltepipette fixiert und so fokussiert, dass die Vorkerne sichtbar waren. Die DNA-Lösung wurde dann mit einer Injektionskapillare mittels Mikromanipulatoren (Fa. Leitz/Wetzlar) unter leichtem Druck in einen der Vorkerne injiziert. Nach erfolgreicher Mikroinjektion wurden die befruchteten Oozyten in das Infundibulum des Eileiters eingeführt.

Fa. Harlan/Borchen

Fa. Charles River/Sulzfeld

PMS (Pregnant mare's serum, Fa. Sigma/Deisenhofen)

hCG (human Chorionic Gonadotropin, Fa. Sigma/Deisenhofen)

Mikroskop: Labovet FS (Fa. Leitz/Wetzlar)

II.10.2 Vorbereitung des Injektionsfragments

Zur Herstellung transgener Mäuse wurden die Vektorsequenzen von den subklonierten Injektionsfragmenten durch Restriktionsverdau (siehe II.7.6.1) abgespalten und durch Agarosegelelektrophorese (siehe II.7.3) abgetrennt. Die Injektionsfragmente wurden, wie in Abschnitt II.7.4. beschrieben, präpariert und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Injektion wurde die linearisierte DNA aufgetaut und durch einen 0,45 mm-Filter (Fa. Millipore über Fa. Schleicher u. Schüll/Dassel) zentrifugiert, um Partikel zu entfernen, die zur Verstopfung der Injektionskapillare hätten führen können.

II.10.3 Genotypisierung transgener Mäuse

Nach einer Mikroinjektion wurden die Tiere der F₀-Generation auf Transgenität untersucht. Hierzu wurde die genomische DNA aus Schwanzspitzen der 14-Tage alten Mäuse präpariert (siehe II.7.1.2) und mittels PCR (siehe II.7.9) analysiert. Jedes transgene F₀-Tier wurde als Gründer einer neuen Mauslinie betrachtet. Die Nachkommen jeder Linie wurden routinemäßig mit Hilfe der PCR auf ihre Transgenität hin überprüft.

II.10.4 Präparation von Mausembryonen

Für die Präparation von Embryonen eines bestimmten Stadiums der Embryonalentwicklung wurden die Elterntiere über mehrere Tage zusammen in einem Käfig gehalten und das Weibchen jeden Morgen auf einen Vaginalpfropf als Zeichen der erfolgten Befruchtung untersucht. Trat ein Vaginalpfropf auf, so wurde der Zeitpunkt als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung (E0,5) angesehen. Zur Entnahme der Embryonen wurden trächtige Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum eröffnet. Der Uterus wurde entnommen, in eiskaltes PBS überführt und die Embryonen unter einem Stereomikroskop von allen embryonalen Membranen befreit. Die genomische DNA des Dottersacks wurde isoliert (siehe II.7.1.2) und zur Genotypisierung mittels PCR-Analyse verwendet (siehe II.7.9). Die Embryonen wurden entweder für die Histologie in Tissue Tek (Sakura, Japan) bei -80°C eingefroren oder für die RNA-Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

II.10.5 Entnahme von Gewebe und Tumoren

Zur Präparation von Organen und Tumoren wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die entsprechenden Gewebe freipräpariert und kurz in eiskaltem PBS gewaschen. Für histologische Analysen von Organen und Tumoren wurden sie in Tissue Tek (Sakura, Japan) eingebettet, in einem Trockeneis/Isopentan-Bad eingefroren und bei -80°C gelagert. Für RNA-Präparationen aus Tumoren wurden diese nach der Entnahme in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

II.11 *In vivo* Versuche

Alle *in vivo* Experimente erfolgten an adulten 10-16 Wochen alten Mäusen des genetischen Hintergrunds C57/BL6 und wurden mindestens zweimal wiederholt.

II.11.1 Experimentelle Tumormodelle

II.11.1.1 Injektion etablierter Tumorzellen in Mäuse

Adhärente Wildtyp oder stabil transfizierte BFS-1 Fibrosarkoma Zellen bzw. B16 Melanoma Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung je 75 cm² Kulturflasche inkubiert, bis sich die Zellen von der Kulturschale ablösten. Die Zellen wurden in 5 ml PBS aufgenommen, durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT) sedimentiert und in 10 ml PBS aufgenommen. Während eines erneuten Zentrifugationsvorganges wurde die Gesamtzellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer bestimmt und das Sediment auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ /50 µl PBS eingestellt. Zur subkutanen Injektion der Zellen in syngene Mäuse wurden diese mit Fluothan (Zeneca) narkotisiert und jedem Tier zwei Injektionen von $1,5 \times 10^6$ Zellen/50 µl PBS nebeneinander auf den rasierten Rücken verabreicht. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 7, 14 Tage) nach Injektion wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet, die Tumoren präpariert, gewogen und für die histologische Analyse oder RNA-Präparation verwendet (siehe II.8.1 und II.10.5)

II.11.1.2 Co-Injektion etablierter Tumorzellen und retrovirusproduzierender Zellen

Für den retroviralen Gentransfer *in vivo* wurden BFS-1 Fibrosarkoma Zellen oder B16 Melanoma Zellen zusammen mit retrovirusproduzierenden GP+E86 syngen Wildtyp Mäusen co-injiziert. Hierbei stellte die Verpackungszelllinie GP+E86 replikationsdefiziente Retroviren her, die für Lodavin (GP+E86/Lodavin) oder die Deletionsmutante dnEts-1 (GP+E86/dnEts-1) codierten. Als Negativkontrolle dienten GP+E86 Zellen, die stabil mit dem pLXSN-Plasmid transfiziert waren (GP+E86/empty). Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz wie unter II.11.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Es wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen/50 µl zusammen mit $1,5 \times 10^6$ GP+E86 Zellen/50 µl injiziert, so dass das Gesamtvolumen pro Injektion 100 µl betrug. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 7, 14 Tage) nach Injektion wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet, die Tumoren präpariert, gewogen und für die histologische Analyse oder RNA-Präparation verwendet (siehe II.8.1 und II.10.5).

II.11.2 *In vivo* Bindungsstudien

Da die Analyse adulter Flk-1-Lodavin Tiere eine Expression des Transgens im Endothel der Milz bestätigte, wurden diese Tiere ohne Transplantation eines Tumors für erste *in vivo* Bindungsstudien verwendet. Zur Kontrolle dienten Wildtyp Mäuse gleichen Alters. Die Tiere wurden zunächst für mehrere Minuten unter einer Rotlichtlampe gehalten, damit sich die Schwanzvenen besser darstellten und die Injektion einfacher durchzuführen war. Die Mäuse wurden anschließend mit Fluothan (Zeneca) inhalationsnarkotisiert und bewegungsfixiert. Die biotinylierten Liganden wurden in PBS verdünnt und in den angegebenen Volumina über eine der Schwanzvenen verabreicht (siehe Tab. II.6). Einzige Ausnahme stellte die Applikation der 4 µm großen Fluorospheres dar. Diese wurden am narkotisierten Tier über die frei präparierte *Vena femoralis* injiziert und das Tier dabei für ca. 20-30 min in der Narkose gelassen. Zur Vasodilatation erhielten die Tiere ca. 15 min vor der Perfusion eine intraperitoneale Heparinapplikation. Die Mäuse wurden durch eine Überdosis Fluothan eingeschläfert. Zügig wurde der Brustkorb eröffnet, das Herz und die Aorta frei präpariert und eine Knopfkanüle über den linken Ventrikel in die *Aorta ascendens* geführt. Mit einem chirurgischen Faden wurde diese fixiert und schließlich die *Vena cava* durchtrennt. Die Perfusion erfolgte mit 60 ml PBS unter einem Druck von 80 cm H₂O-Säule innerhalb von ca. 10-15 min. Nach der Perfusion wurden Milz, Leber, Niere und Lunge entnommen und in PBS gewaschen. Die Organe wurden in TissueTek (Sakura/Tokyo, Japan) eingebettet, in einem Trockeneis/Isopentan-Bad eingefroren und bis zur immunhistologischen Analyse bei -80°C gelagert.

biotinylierter Ligand	appliziertes Volumen (Stock-Konzentration)	Zeitpunkt der Perfusion nach Injektion	Darstellung des Liganden im Gewebe	Hersteller
HRP	50 µl (1mg/ml) 100 µl (1mg/ml)	15, 90 und 120 min	direkte AEC Färbung o. IHC mit α-HRP-IgG	Pierce (Rockford,USA)
rb-IgG	50 µl (2,5mg/ml)	15 min, 6 h und 24 h	IF mit α-rb-IgG	Pierce (Rockford,USA)
Fluorescein	50 µl (2mg/ml) 100 µl (2mg/ml)	15 min	Fluoreszenzmikroskopie	Pierce (Rockford,USA)
Fluorospheres 4 µm	100 µl (3,1x10 ⁸ P/ml)	15 min	Fluoreszenzmikroskopie	Molecular Probes (Willow, Eugene)
Fluorospheres 1 µm	100 µl (1,8x10 ⁹ P/ml)	15 min und 6 h	Fluoreszenzmikroskopie	Molecular Probes (Willow, Eugene)
Fluorospheres 0,04 µm	100 µl (2,3x10 ¹⁴ P/ml)	15 min	Fluoreszenzmikroskopie	Molecular Probes (Willow, Eugene)

Tab. II.6 Übersicht der applizierten biotinylierten Liganden

(AEC) 3-Amino-9-Ethylcarbazol, (HRP) Meerrettich Peroxidase, (IF) Immunfluoreszenz, (IHC) Immunhistochemie, (P) Partikel, (rb) Kaninchen

Der Nachweis der biotinylierten Meerrettich Peroxidase (HRP) erfolgte durch zwei verschiedene Methoden. Zum direkten Nachweis wurden die 8-10 µm dicke Schnitte der Organe für 10 min in -20°C Aceton fixiert, mindestens 30 min bei RT getrocknet und in PBS rehydriert. Endogene Peroxidase wurde durch eine 30 minütige Inkubation mit 0,3% H₂O₂-Methanol-Lösung blockiert. Für die Visualisierung der applizierten HRP wurde der AEC-Kit der Firma Sigma/Deisenhofen verwendet. Die Entwicklung der Schnitte wurde im Lichtmikroskop kontrolliert und in Leitungswasser gestoppt. Zum indirekten Nachweis wurden die Organschnitte für eine immunhistochemische Färbung verwendet (siehe II.12.2). Anschließend folgte bei beiden Methoden eine Gegenfärbung der Zellkerne in Hämatoxylin Gill Nr.1-Lösung (Sigma) für 45 Sekunden gefolgt von mehreren Waschschritten in Leitungswasser. Die Schnitte wurden wässrig in Aquatex (Merck/Darmstadt) eingedeckt. Der Nachweis des biotinylierten Kaninchen Immunglobulins (rb-IgG) erfolgte mittels indirekter Doppel-Immunfluoreszenzfärbung (siehe II.12.3). Zum Nachweis der fluoreszierenden Liganden (Fluorescein, Fluorospheres) wurden 8-10 µm dicke Schnitte der Organe angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und diese direkt im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss/Oberkochen) ausgewertet.

II.12 Immunhistologie von Gewebeschnitten

II.12.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die in Tissue Tek (Sakura/Tokyo, Japan) eingebetteten und auf -80°C gelagerten Mausgewebe wurden für mindestens 30 min auf -20°C erwärmt. 8-10 µm dicke Schnitte des Gewebes wurden im Kryostat bei einer Kammertemperatur von -20°C und einer Messertemperatur von -15°C angefertigt und auf beschichtete Objektträger transferiert. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und entweder sofort für die immunhistochemische Färbung bzw. Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder auf unbestimmte Zeit bei -80°C mit Silikagel gelagert.

II.12.2 Immunhistochemische Färbung

Die eingefrorenen Gewebeschnitte wurden für mindestens 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 min mit -20°C kaltem Aceton fixiert und mindestens 30 min luftgetrocknet. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift (DAKO, Hamburg) umrandet, 2 x 5 min in PBS rehydriert und anschließend mit je 100 µl Blocklösung für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Blocklösung wurde abgesaugt und

pro Schnitt 80 µl des Erstantikörpers aufgetropft (Tab II.1). Verdünnungen wurden in Blocklösungen erstellt. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei RT in einer Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte 2 x für 5 min mit PBST gewaschen und gegebenenfalls die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 3% H₂O₂ in Methanol für 15 min bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Schnitte erneut 2 x 5 min bei RT mit PBST gewaschen. Zur weiteren Detektion des Erstantikörpers wurde der Vectastain-ABC-Elite-Kit (Vector Laboratories/Burlingame, USA) entsprechend der Spezies des Erstantikörpers verwendet. Dabei wurden die Angaben des Herstellers beachtet und die Schnitte zwischen den Inkubationsschritten wie zuvor beschrieben gewaschen. Für die Peroxidase-vermittelte Visualisierung der antikörpermarkierten Proteine wurde der AEC-Kit der Firma Sigma/Deisenhofen verwendet. Die Entwicklung der Schnitte wurde im Lichtmikroskop kontrolliert und in Leitungswasser gestoppt. Anschließend folgte eine Gegenfärbung der Zellkerne in Hämatoxylin Gill Nr.1-Lösung (Sigma) für 45 Sekunden gefolgt von mehreren Waschschritten in Leitungswasser zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs. Die Schnitte wurden anschließend wässrig in Aquatex (Merck/Darmstadt) eingedeckt. Als Negativkontrollen entfiel die Inkubation des Erstantikörpers oder es wurden Isotypenantikörper eingesetzt.

Blocklösung 0,1% Tween 20 in PBS

10 % Serum aus Spezies des zweiten Antikörpers

PBST 0,1% Tween 20 in PBS

II.12.3 Indirekte Doppel-Immunfluoreszenzfärbung

Um die endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine Lodavin oder Scavidin bzw. die Co-Lokalisation dieser mit einem applizierten biotinylierten Liganden nachzuweisen, wurden die Gefrierschnitte der Gewebe einer Doppel-Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Je nach Ansatz wurden die in Tabelle II.7 aufgeführten Inkubationsschritte und Antikörperverdünnungen an den angegebenen Geweben eingehalten. Hierzu wurden die Gewebeschnitte wie unter II.12.2 beschrieben aufgetaut, fixiert und rehydriert. Die folgenden Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte für mindestens 20 min mit 200 µl Blocklösung inkubiert. Anschließend folgte die gemeinsame Inkubation der Erstantikörper für 1 h (Inkubation I) gefolgt von zwei 5 minütigen Waschschritten und die Inkubation des fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers gerichtet gegen einen der beiden Erstantikörper (Inkubation II). Nach erneutem zweimaligem Waschen folgte die

Inkubation des zweiten markierten Zweitantikörpers (Inkubation III) gerichtet gegen den zweiten der beiden Erstantikörper. Nach diesem dritten Inkubationsschritt wurden die Schnitte 3x für 5min in PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckt.

Blocklösung 30min, RT	Inkubation I 1h, RT	Inkubation II 1h, RT	Inkubation III 1h, RT	Gewebe
10 % rbserum + 0,2 % Triton in PBSA	mAK rat- α - muPECAM-1 (ÜS) + goat- α -Avidin 12 μ g/ml	rb- α -goatIgG Alexa488 1:500 in Blocklsg.	goat- α -rat- Alexa594 1:500 in Blocklsg.	Embryo Tumor
10 % rbserum + 0,2 % Triton in PBSA	mAK rat- α - muVEGFR-2 (ÜS) + goat- α -Avidin 12 μ g/ml	rb- α -goatIgG Alexa488 1:500 in Blocklsg.	goat- α -rat- Alexa594 1:500 in Blocklsg.	Embryo Tumor
10 % rbserum + 0,2 % Triton in PBSA	rb- α -HRP (1:500) + goat- α -Avidin 12 μ g/ml in Blocklsg.	ch- α -rbIgG Alexa594 1:500 in Blocklsg.	rb- α -goat- Alexa488 1:500 in Blocklsg.	Milz, Niere, Lunge, Leber

Tab. II.7 Übersicht von Blocklösungen sowie Erst- und Zweitantikörperpaaren für die indirekte Doppel-Immunfluoreszenzfärbung

(α) anti, (Alexa488) Alexa Fluor® 488, (Alexa594) Alexa Fluor® 594, (ch) Huhn, (goat) Ziege, (mAK) monoklonaler Antikörper, (mu) murin, (PBSA) 5% BSA in PBS, (rb) Kaninchen, (rat) Ratte, (RT) Raumtemperatur, (ÜS) Hybridomüberstand

II.12.4 Herstellung von Mowiol-Lösung

Mowiol wurde als Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen verwendet, da es lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe konserviert, so dass Präparate über einen Zeitraum von etwa drei Monaten analysiert werden können.

Zur Herstellung der Mowiol-Lösung wurden 6 g Glycerol mit 2,4 g Mowiol und 6 ml H₂O auf einem Drehrad für 2 h gemischt. Danach wurden 12 ml Tris/HCl (200 mM, pH 8,5) zugefügt und die Suspension wurde 30 min bei 50-60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur schloss sich eine 15 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C an. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde die Mowiol-Lösung bei 37°C aufgetaut und 10 mg/ml DABCO (Sigma/Deisenhofen) darin gelöst.

II.13 Gewebekultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar Air Flow Hood) mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Generell wurden für die Zellkultur Plastikwaren der Hersteller Costar/Cambridge (USA), Falcon-Becton Dickinson/Plymouth (England), Greiner GmbH/Frickenhausen und Nunclon/Roskilde (Dänemark) verwendet.

II.13.1 Standardlösungen und -medien für die Gewebekultur

PBS	„Phosphate buffered saline“, 1x (Seromed, Berlin)
DMEM ⁺	Dulbecco`s Modifikation von Eagle`s Medium mit 4,5 g/l Glukose (Gibco BRL, Eggenstein)
RPMI-1640	(Gibco BRL, Eggenstein)
MCDB131	(Gibco BRL, Eggenstein)
FCS	Fötales Kälberserum (Cytogen, Costar, Bodenheim) (Lot Nr. A01125-213, PAA Laboratories, Cölbe) (Ch.-B. S604920, PAN Systems, Aidenbach)
CS	Kälberserum (Sigma, Deisenhofen)
Gln	200 mM Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein), Endkonzentration 2mM
Pyruvat	100 mM (Gibco BRL, Eggenstein), Endkonzentration 1 mM
Trypsin/EDTA-Lösung	0,5 g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA (PAA Laboratories, Cölbe)
P/S	Penicillin-Streptomycin (Bio Whittaker, Verviers, B) 10000 Einheiten/ml Penicillin, 10000 mg/ml Streptomycin Endkonzentration 1% (v/v)
Gelatine	1% (w/v) in ddH ₂ O (Serva, Heidelberg)
G418	50 mg/ml (Gibco BRL), Endkonzentration 1 mg/ml
Puromycin	Endkonzentration 0,8 µg/ml (AG Scientific)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt)

II.13.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Medium
A293	humane embryonale Nierenzellen	ATCC	2
B16	murine Melanoma Zelllinie	D.Männel, Regensburg	2
BFS-1	durch Methylcholanthrene A Transformation hergestellte murine Fibrosarkoma Zelllinie (freundliche Gabe von Prof. D. Männel, Universität Regensburg)	(Hafner et al., 1996)	4
BFS-1/rtTA-Scavidin	prtTA-Scavidin transfizierte BFS-1 Linie	diese Arbeit	4
BFS-1/rtTA-Lodavin	prtTA-Lodavin transfizierte BFS-1 Linie	diese Arbeit	4
COS-1	SV-40 transformierte Affen-Nieren-Epithelzellen	(Gluzman, 1981)	3
GP+E86	Verpackungszelllinie zur Helfervirus-freien Produktion ecotroper Retroviren	(Markowitz et al., 1988)	1
GP+E86/LXSN	pLXSN transfizierte GP+E86 Linie	R.Heidenreich	1
GP+E86/Scavidin	pLXSN-Scavidin transfizierte GP+E86 Linie	diese Arbeit	1
GP+E86/Lodavin	pLXSN-Lodavin transfizierte GP+E86 Linie	diese Arbeit	1
GP+E86/dnEts-1	pLXSN-dnEts-1 transfizierte GP+E86 Linie	diese Arbeit	1
HUE	spontan immortalisierte humane Endothelzellen	ATCC, Rockville, USA	5
NIH 3T3	immortalisierte Mausfibroblasten	(Jainchill et al., 1969)	1

II.13.3 Verwendete Medien

Nr.	Basis	Serum	Glutamin	Pen/Strep	NEAA	Pyruvat
1	DMEM+	10% CS	-	-	-	-
2	DMEM+	10% FCS	2%	1%	-	-
3	DMEM+	10% FCS	2%	1%	1%	1%
4	RPMI 1640	10% FCS	2%	1%	-	1%
5	MCDB 131	8% FCS	2%	1%		

Tab. II.8 Übersicht über die verwendeten Medien

(CS) Kälber Serum, (FCS) fötales Kälber Serum, (NEAA) nicht essentielle Aminosäuren, (Pen/Strep) Penicil+Streptolysin

II.13.4 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen wie unter II.13.5 beschrieben von der 75 cm³ Gewebekulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium mit 10% DMSO und 20% Serum resuspendiert, auf drei Kryo-Röhrchen (Fa. Greiner/Solingen) verteilt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff eingelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Kryo-Röhrchen in einem Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer 75 cm²-Gewebekulturflasche ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium noch einmal gewechselt.

II.13.5 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte im entsprechenden Wachstumsmedium (siehe Tab. II.8) auf Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 7% bzw. 5% CO₂. Bei den adhärenenten Zellen wurde das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 75 cm² solange bei 37 °C inkubiert, bis sie sich abzulösen begannen. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach Zugabe von 5ml Wachstumsmedium durch die darin enthaltenen Trypsininhibitoren gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen (Falcon) überführt und für 5 min bei 1000 rpm (Zentrifuge 4K10) und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet vorsichtig in frischem Medium resuspendiert und in einer der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen entsprechenden Verdünnung (1/3 - 1/10) in neuen Gewebekulturschalen ausgesät (Passagieren).

II.13.6 Gelatinisierung von Zellkulturschalen

Für die Kultivierung von GP+E86 Zellen, wurde der Boden der Zellkulturschale zunächst mit 1% Gelatinelösung bedeckt, und die Schale für mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Die Gelatinelösung wurde abgesaugt, und die beschichtete Schale für die Kultivierung der Zellen und deren Transfektanten sofort verwendet.

II.13.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden wie unter II.13.5 beschrieben von der Kulturschale abgelöst und in einem definierten Volumen Wachstumsmedium resuspendiert. Eine geringe Menge der Zellsuspension wurde entnommen, die Zellen mit einem Neubauer-Hämacytometer ausgezählt und die Zellzahl bezogen auf das Gesamtvolumen bestimmt.

II.13.8 Transfektionen und Infektionen eukaryotischer Zellen

II.13.8.1 Transiente und stabile Transfektion mittels Liposomen

In dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen mit COS-1, A293 und HUE Zellen mittels SuperFect sowie stabile Transfektionen von BFS-1 Zellen mittels Effectene durchgeführt. Beide Liposomen stammen vom Hersteller Qiagen/Hilden.

Bei der transienten Transfektion wird keine Selektion auf die Aufnahme des Plasmids durchgeführt, so dass die eingebrachte DNA extrachromosomal verbleibt. Hierzu wurden die Zellen auf 3cm-Zellkulturplatten so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 40-60% konfluent waren. Folgte der Transfektion eine Immunfluoreszenzfärbung, so wurden sie zusätzlich auf Deckgläsern kultiviert. Zur Herstellung des DNA-Liposomen-Komplexes wurden 2 µg DNA in 100 µl des entsprechenden Zellkultur-Grundmediums ohne Zusatz von Seren verdünnt und mit 10 µl des SuperFect-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 10 min bei Raumtemperatur wurden 600 µl serumhaltiges Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem DNA-Liposomen-Komplex für 2-3 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit neuem Wachstumsmedium für 24-48 h im Brutschrank belassen, um eine maximale Proteinsynthese der Fremd-DNA zu erhalten. Es folgte dann die Aufarbeitung der Zellen für die Immunfluoreszenz (siehe II.13.10), Bindungsstudien (siehe II.13.11) bzw. für die Luziferase-Reportergen-Analyse (siehe II.13.13).

Zur Durchführung der stabilen Transfektion von BFS-1 Zellen wurden diese 24 Stunden zuvor auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert, so dass sie am Tag der Transfektion zu 40-70% konfluent waren. Zur Herstellung des DNA-Liposomen-Komplexes wurden 2 µg DNA zusammen mit 16 µl eines Enhancers in 300 µl des Reaktionspuffers EC verdünnt, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µl Effectene und erneutes Mischen für ca. 10 sek. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde 3 ml frisches Wachstumsmedium auf den DNA-Liposomen-Komplex gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, 7 ml frisches Medium aufgelegt,

schließlich der komplette Reaktionsmix auf die Zellen getropft und durch Wiegen der Zellkulturschale gemischt. Nach Ablauf einer 4 stündigen Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit neuem Wachstumsmedium für weitere 24 Stunden im Brutschrank belassen. Anschließend wurde Zellen selektioniert, die die Fremd-DNA in ihr Genom integriert hatten. Dies erfolgte mit Hilfe von Antibiotika-Resistenzgenen, die in den transfizierten Plasmiden enthalten sind. Die Zellen wurden mit der vorher bestimmten optimalen Antibiotika-Konzentration von 0,8 µg/ml Puromycin im Wachstumsmedium kultiviert bis Zellklone von stabilen Transfektanten zwischen den toten oder wachstumsinhibierten Zellen auf der Kulturschale sichtbar wurden. Diese Zellklone wurden isoliert und in getrennten Kulturschalen vermehrt.

Puromycin

Endkonzentration 0,8 µg/ml (AG Scientific)

II.13.8.2 Stabile Transfektion von GP+E86 Zellen zur Generierung von Retroviren

Zur Generierung der Viren wurden der retrovirale Vektor pLXSN (BD Bioscience Clontec) sowie die Verpackungszelllinie GP+E86 verwendet. Der Vektor enthält Elemente, die vom „Moloney murine leukemia virus“ (MoMuLV) sowie dem „Moloney murine sarcoma virus“ (MoMuSV) stammen. Hierbei dient die virale 5'LTR als Promotor und Enhancer, die die Expression des in die MCS eingebrachten heterologen Gens (hier Lodavin, Scavidin oder dnEts-1) kontrolliert. Zudem reguliert der im Vektor enthaltene „SV40 early promotor“ (P_{SV40e}) die Expression des Neomycin-Resistenz-Gens (Neo^r), das die Selektion in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Durch stabile Transfektion des Plasmids in die Verpackungszelllinie integriert dieser in das Genom. Dies führt zur Herstellung eines Transkripts (Vektor RNA), das neben dem heterologen Gen auch das virale Verpackungssignal ϕ^+ sowie Selektionsmarker enthält. Die Verpackungszelllinie GP+E86 enthält zwei voneinander unabhängige Konstrukte, die für virale strukturelle und enzymatische Proteine codieren. So exprimiert das eine Konstrukt die Gag-Genprodukte codierend für virusinterne Strukturproteine und die Pol-Genprodukte codierend für die reverse Transkriptase sowie Integrase. Das zweite Konstrukt exprimiert die Hüllproteine env. Die entstehenden rekombinanten retroviralen Vektorpartikel können im Folgenden zur Infektion von Zielzellen verwendet werden. Das im Virus enthaltene Vektor-RNA-Genom, welches das heterologe Gen trägt, wird in der Zielzelle in eine doppelsträngige DNA revers transkribiert. Diese DNA integriert in das Genom, wodurch das entsprechende Gen wie ein zelluläres Gen exprimiert wird. Es ist jedoch keine weitere

Virusproduktion in den infizierten Zellen möglich, da die genetische Information für die viralen strukturellen und enzymatischen Proteine nicht vorliegt.

Die zu transfizierenden GP+E86 Zellen wurden am Vortag so auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu etwa 30-50% konfluent waren. Bereits 90 min vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden dann 450 µl ddH₂O vorgelegt, je 10-20 µg zirkuläre DNA zugegeben und die Lösung nach Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde jedem Ansatz tropfend und unter vortexen 500 µl 2 x HBS zugegeben und für weitere 20-25 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die DNA-Lösung mit einer Pipette gemischt und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Zur optimalen Präzipitatbildung wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die transfizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Wachstumsmedium für weiter 24-48 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Selektion in optimierter Antibiotika-Konzentration auf Klone, die die DNA in ihr eigens Genom integrierten. Diese Zellklone wurden isoliert und in getrennten Kulturschalen vermehrt.

2 x HBS: 50 mM HEPES/NaOH; pH 7,5
 250 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄ -Na₂H₂PO₄

II.13.8.3 Infektion von Nagerzellen mittels Retroviren

In dieser Arbeit wurden NIH 3T3 Fibroblasten und BFS-1 Fibrosarkoma Zellen mit ecotropen Retroviren infiziert, die für Lodavin, dnEts-1 oder den Leervektor (pLXSN) codierten. Die virusproduzierenden Zellen (GP+E86/Lodavin, GP+E86/dnEts-1/ und GP+E86/empty) wurden am Abend vor der Infektion 1:2 gesplittet und die zu infizierenden Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion ca. 60-80 Konfluenz erreicht hatten. Unmittelbar vor der Infektion wurde das durch die virusproduzierenden Zellen konditionierte Medium abgenommen, durch 10 min auf 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 8 µg/ml Polybren versetzt. Die NIH 3T3 bzw. BFS-1 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend soviel Virusgemisch hinzugegeben, dass die Kulturschale gerade bedeckt ist. Danach wurden die Zellen für 3h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit frischem

Wachstumsmedium für weitere 48 h kultiviert. Die so infizierten Zellen wurden schließlich für die Western Blot Analyse aufgearbeitet (siehe II.9.1-3).

Polybren Hexadimethin Bromid (Sigma, Deisenhofen), Stocklösung 1 mg/ml

II.13.9 Titerbestimmung von virusproduzierenden GP+E86 Zellen

Zur Bestimmung des Virustiters wurden die G418-resistenten GP+E86 Zellen nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in einem Verhältnis von 1:2 auf neue Kulturflaschen verteilt und über Nacht (ca. 16 h) inkubiert. Der Virusüberstand wurde abgenommen, 10 min auf 2000 rpm zentrifugiert und in Verdünnungen von 1:200 und 1:2000 zur Infektion von NIH 3T3 Zellen eingesetzt (siehe II.13.8.3), von denen am Vortag 10^5 bzw. 5×10^5 auf 6 cm Kulturschalen verteilt worden waren (siehe II.13.5). Zwei Tage nach der Infektion wurden die NIH 3T3 Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in einem Verhältnis von 1:15 auf 63 cm² Kulturschalen verteilt. Ab diesem Zeitpunkt wurde dem Wachstumsmedium 1 mg/ml G418 (Gibco BRL) zur Selektion zugesetzt und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Zellen, welche das Virus nicht aufgenommen und in das Genom integriert hatten, starben innerhalb weniger Tage ab. Nach 7-14 Tagen wurden die Zellklone, welche sich aus den resistenten Zellen gebildet hatten, für 20 min bei RT mit Kristallviolett-Lösung (0,5% (w/v) in 30% Methanol) gefärbt und gezählt. Der Virustiter berechnete sich aus der Anzahl der Klone multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor unter Berücksichtigung des zur Infektion eingesetzten Volumens und wird in koloniebildenden Einheiten (cfu = „colony forming units“) pro ml Kulturüberstand angegeben.

II.13.10 Immunfluoreszenz transienter und stabil transfizierter Zellen

Um die Genexpression transduzierter Zellen zu untersuchen, wurden diese auf ein 22 x 22 mm großes Deckglas in 3 mm Schalen ausplattiert, so dass sie am Tag der Immunfluoreszenzfärbung zu 50-70% konfluent waren. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen, anschließend für 10-20 min bei RT mit kalter 3,7% Formalin-PBS-Lösung fixiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine zwanzig minütige Inkubation mit Natriumborhydrid (1 Spatelspitze auf 100 ml PBS), um freie Aldehydgruppen zu reduzieren. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen mit 0,2% Triton in PBS behandelt und anschließend dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Der gegen das von den Zellen exprimierte Protein gerichtete Erstantikörper wurde wie in Tab. II.1 angegeben in einem Puffer (0,5% Tween, 0,5% BSA in PBS)

verdünnt und die Zellen damit für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS folgte die Inkubation des mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zweitantikörpers für eine Stunde bei RT (siehe Tab. II.2). In den letzten 10 Minuten dieser Inkubation wurde der DNA-Farbstoff Hoechst 33258 in einer Konzentration von 2 µg/ml zugegeben, anschließend erneut mehrfach mit kaltem PBS gewaschen und die Deckgläser schließlich mit Mowiol (siehe II.12.4) auf Objekträgern eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss/Oberkochen). Die Fotos wurden mit der Axicam (Zeiss/Oberkochen) erstellt.

II.13.11 *In vitro* Bindungsstudien

Um die Bindungseigenschaften der Fusionsproteine Lodavin und Scavidin *in vitro* zu testen, wurden die Plasmide pFlk-1-Lodavin und pFlk-1-Scavidin in die immortalisierte Endothelzelllinie HUE transient transfiziert (siehe II.13.8.1). Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5, 10 bzw. 20 µg/ml biotinyliertem Fluorescein für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen der Zellen mit PBS wurde diese für 10 min bei -20°C in Methanol fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine durchgeführt (siehe II.13.10). Die Bindung des biotinylierten Liganden in Co-Lokalisation mit den Fusionsproteinen wurde am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss/Oberkochen) ausgewertet.

biotinyliertes Fluorescein (Pierce, USA), Stocklösung 2 mg/ml

II.13.12 *In vitro* Proliferationstest

Um das Proliferationsverhalten von Zellen *in vitro* zu analysieren, wurden 10⁴ BFS-1 (Gruppe I und II) bzw. Zellen des Klons BFS-1/Scavidin (Gruppe III und IV) in 35 mm-Zellkulturschalen ausplattiert und in Zellkulturmedium (Gruppe I und III) bzw. in Medium mit 2 µg/ml Doxzyklin (Gruppe II und IV) kultiviert. In einem weiteren Versuchsansatz wurde zusätzlich 4 ng/ml Biotin (Fluka/Neu-Ulm) dem Medium beigegeben. Nach 3 Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die Gesamtzellzahl jeder Gruppe mit einem Zellzählgerät (Casy-1, Schärfe-System/Reutlingen) bestimmt. Innerhalb eines Versuchs wurden die Zellen als sechsfach Wert bestimmt und mit Hilfe des Programms InStat 2.01 (T-Test für unverbundene Stichproben) ausgewertet. Ein Versuch wurde mindestens zweimal wiederholt.

II.13.13 Luziferase-Reportergen-Analyse

24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und für die luminometrische Analyse aufgearbeitet. Dabei wurde der Dual Light Kit (Tropix, Bedford, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Luziferase- und LacZ-Aktivitäten wurden nacheinander im Luminometer gemessen und der Quotient der erhaltenen relativen Licht-Einheiten (RLU) gebildet. Innerhalb eines Reporter-Experiments wurden die Werte in Triplikaten gemessen und der Mittelwert bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms InStat 2.01 (T-Test für unverbundene Stichproben).

In einem typischen Experiment wurden je 0,5 µg Luziferase Reporterplasmid, 0,3 µg β-Galaktosidase Reporter und je 0,5, 1 bzw. 2 µg Expressionsplasmide von Transkriptionsfaktoren in A293 und HUE Zellen co-transfiziert. Um in jedem Ansatz identische DNA Mengen zu erhalten, wurde zusätzlich pcDNA3 Vektor co-transfiziert. Die DNA wurde mit 100 µl Medium (ohne Serum oder Zusätze) und 10 µl Superfect (Qiagen, Hilden) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mixtur wurde dann auf ca. 70% konfluente A293 oder HUE Zellen in 6-Loch-Kulturplatten gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Wachstumsmedium weiter kultiviert. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lyse-Puffer geerntet (Dual Light Kit), 10 min bei 11000 rpm sedimentiert (Tischzentrifuge) und 5 µl des Überstandes für die luminometrische Messung von Luziferase und β-Galaktosidase Aktivität eingesetzt. Jedes Experiment wurde mindestens dreifach durchgeführt.

II.13.14 Tetrazyklin-basierende Systeme zur regulierten Genexpression

Die ursprünglichen Tet-Systeme basieren auf dem Tet-Repressor (TetR) aus *E.coli*, der die Gene des Tetrazyklin-Resistenz-Operon des Tn10 Transposons negativ reguliert. In Abwesenheit von Tetrazyklin (Tc) bindet TetR an die tet Operator-Sequenz (*tetO*) und blockiert damit die Transkription. Durch Fusion der Aminosäuren 1-207 des TetR mit den 127 carboxy-terminalen Aminosäuren des VP16 Proteins des Herpes Simplex Virus wird dieser Repressor zum Transaktivator. Das Hybridprotein wird als Tc-antwortender Transaktivator (tTA) bezeichnet, das zur Bindung an das korrespondierende tet-responsive Element (TRE) fähig ist. Im Tet-off System geschieht dies in Abwesenheit von Tetrazyklin (Tc) oder Doxyzyklin (Dox) und führt zur Induktion der Expression eines heterologen Zielgens, das durch TRE reguliert wird. Die Transaktivierung des Zielgens wird so durch die Gabe von Tc oder Dox blockiert. Im Tet-on System wird durch den

Austausch vier verschiedener Aminosäuren aus dem tTA ein reverser Tc-antwortender Transaktivator (rtTA). Da eine Genexpression nur in Gegenwart von Tc oder Dox stattfinden kann, ist dieses System für *in vivo* Anwendungen besser geeignet.

Bei beiden Tet-Systemen bedarf es der Co-Transfektion zweier Plasmide in die Zielzelle. Das Regulatorplasmid (ptTA oder prtTA) ist dabei unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven oder zellspezifischen Promotors, der für den Transaktivator codiert. Dieser wiederum bindet als Dimer an das TRE des so genannten Antwortplasmids (pTRE) und reguliert dabei die Expression des Zielgens. Das TRE seinerseits besteht aus sieben Kopien einer 42-bp *tetO*-Sequenz und ist dem Minimalpromotor des Cytomegalivirus ($P_{\min CMV}$) direkt vorgelagert, der über keine eigenen Enhancerelemente verfügt (Abb. II.1).

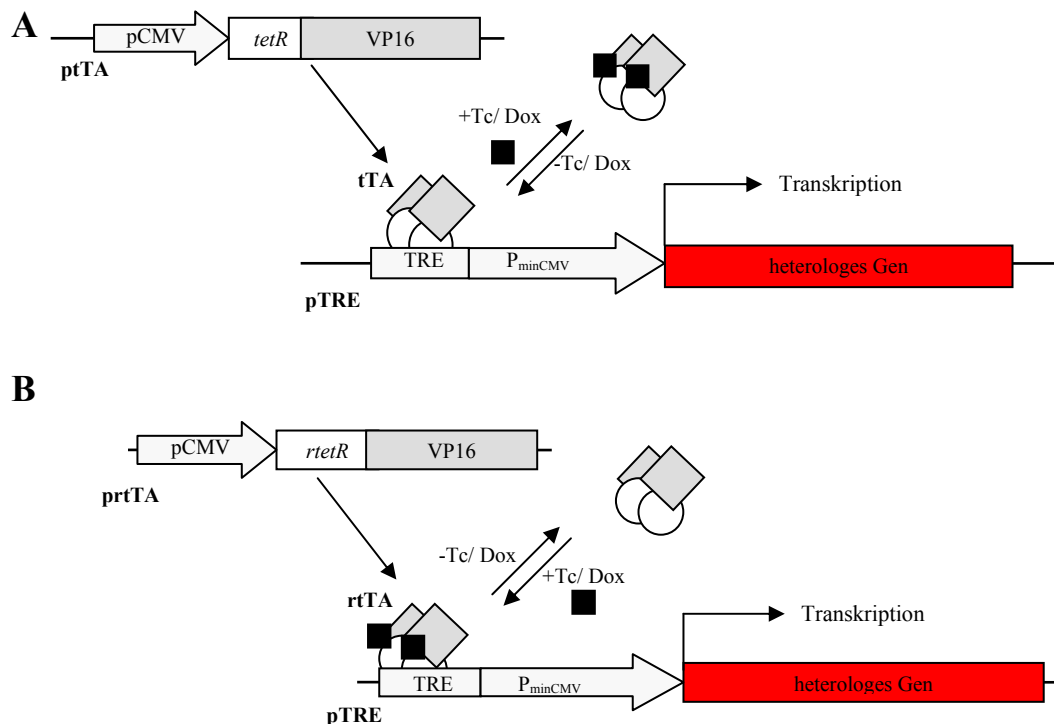


Abb. II.1 Schematische Darstellung der Genregulation im Tet-off und Tet-on System

A. Regulatorplasmid (ptTA) und Responderplasmid (pTRE) des Tet-off Systems. Die Expression des Transaktivators tTA wird durch den CMV-Promotor reguliert. In Abwesenheit eines Induktors bindet tTA am Tetrazyklin-responsiven Element (TRE) des pTRE und bewirkt die Expression des heterologen Zielgens. In Gegenwart des Induktors ist diese blockiert. **B.** Regulatorplasmid (prtTA) und Responderplasmid (pTRE) des Tet-on Systems. Nur in Anwesenheit eines Induktors bindet der reverse Transaktivator rtTA am Tetrazyklin-responsiven Element (TRE) des pTRE und bewirkt die Expression des heterologen Zielgens.

(Tc) Tetrazyklin, (Dox) Doxyzyklin

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Version des Tet-on Systems verwendet (von H. Drexler zur Verfügung gestellt; Abb. II.2). Dieses basiert auf dem retroviralen Plasmid pBabepuro, innerhalb dessen sowohl die regulatorischen Elemente des prtTA- als auch die des pTRE-Plasmids fusioniert vorliegen. Darüber hinaus ist das TRE nicht nur der codierenden Sequenz des heterologen Gens vorgelagert, sondern auch der des Transaktivators selbst. Die Transkription des rtTAs wird somit nicht vom Promotor des Cytomegalivirus oder eines zellspezifischen Promotors reguliert, sondern von der retroviralen 5'LTR. Zudem nimmt der Transaktivator einen positiven Einfluss auf seine eigene Expression. In Gegenwart von Tc bzw. Dox bindet rtTA an den TREs des Plasmids, was sowohl zur Induktion der Expression des heterologen Gens als auch des Regulators führt und damit eine positive Rückkopplung bewirkt: Transaktivator und Transgen werden verstärkt exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konstrukte prtTA-Lodavin und prtTA-Scavidin in die Fibrosarkoma Zelllinie BFS-1 transfiziert und die Zellen anschließend auf stabile Vektorintegration mit Puromycin (Endkonzentration 1 µg/ml) selektiert (siehe II.13.8.1). Zur Induktion der Expression der heterologen Gene *in vitro* wurden die Zellen in Gegenwart von 2 µg/ml Doxzyklin kultiviert. *In vivo* wurde die Expression der Fusionsproteine nach subkutaner Injektion der Zellen (siehe II.11.1.1) durch die Gabe von 100 µg/ml Doxzyklin im Trinkwasser der Tiere induziert.

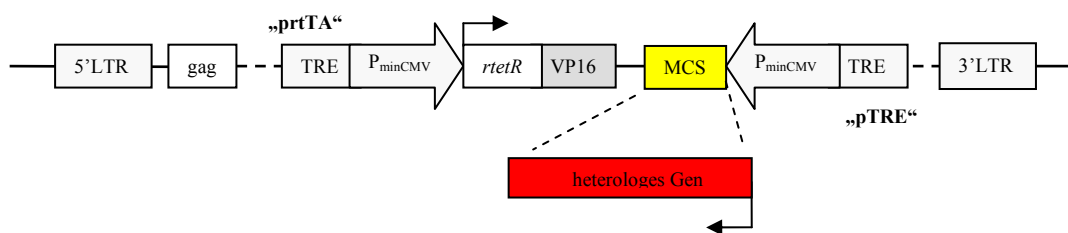


Abb. II.2 Schematische Darstellung der Genregulation im retroviralen Tet-on System

Anteile des Regulatorplasmids (prtTA) und Responderplasmids (pTRE) des ursprünglichen Tet-on Systems sind fusioniert. Die Expression des Transaktivators rtTA wird von der retroviralen 5'LTR kontrolliert. In Anwesenheit eines Induktors bindet rtTA am Tetrazyklin-responsiven Element (TRE), welches sowohl dem heterologen Zielgen als auch rtTA vorgelagert ist. Damit kontrolliert rtTA die Expression des Zielgens und bewirkt gleichzeitig eine positive Rückkopplung seiner eigenen Expression.

III. Ergebnisse

III.1. Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin

Lodavin (Lehtolainen et al., 2003) und Scavidin (Lehtolainen et al., 2002) sind membranständige Fusionsproteine, die aus Anteilen des endozytotischen LDL-Rezeptors bzw. Scavenger Rezeptors A bestehen. Deren ursprüngliche Domänen zur Ligandenbindung wurden deletiert und gegen Avidin ersetzt. Die extrazelluläre Avidindomäne ist zur Bindung von Biotin bzw. eines biotinylierten Liganden fähig, während die Rezeptoranteile die Lokalisierung der Fusionsproteine in die Zellmembran und die Endozytose des gebundenen Liganden vermitteln. *In vitro* und *in vivo* Studien bestätigten, dass beide Fusionsproteine zur spezifischen Bindung biotinylierter Liganden und deren Internalisierung fähig sind (Lehtolainen et al., 2002; 2003). Aufgrund der außergewöhnlich hohen Affinität der Fusionsproteine zu Biotin bzw. biotinylierter Konjugate könnte das Lodavin/Scavidin-System im Rahmen eines gentherapeutischen 2-Schritt Modells für klinische Anwendungen von großem Nutzen sein. Der zell- und/oder gewebespezifischen Expression folgt die systemische Verabreichung des biotinylierten therapeutischen oder diagnostischen Agens. Durch die hohe Affinität wären nur niedrige Konzentrationen nötig, die selektiv und spezifisch im Zielgewebe akkumulieren. Toxische Nebenwirkungen würden minimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten Lodavin und Scavidin in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Systemen untersucht und als therapeutisches bzw. diagnostisches Modell bei Tumorerkrankungen analysiert werden. Hierbei wurde zum einen auf die endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine während des Prozesses der Tumorangiogenese fokussiert wie auch auf die Expression in Tumorzellen selbst. Zusätzlich bot letzteres Modell die Möglichkeit einer regulierten Expression der Fusionsproteine, die in Abhängigkeit eines Induktors an- und abgeschaltet werden sollten.

III.1.1 Endothelzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin

III.1.1.1 Endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine im transgenen Tier

Um die Spezifität anti-angiogener Therapien oder diagnostischer Verfahren zur Darstellung von Tumoren bzw. tumoraler Gefäße zu erhöhen und Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus zu minimieren, müssen therapeutische Gene möglichst lokal im Gefäßsystem des malignen Gewebes exprimiert werden. Im Gegensatz zu den meisten adulten Gefäßbetten erfolgt im Tumorendothel eine deutliche Induktion der VEGF-

Rezeptor-2 (Flk-1) Expression, weshalb für die endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine Lodavin und Scavidin regulatorische Elemente des murinen *flk-1* Gens verwendet wurden. Wie bereits durch Reportergeranlaysen *in vitro* und *in vivo* gezeigt wurde, kann unter der Kontrolle eines 939 bp Fragments aus der 5'flankierenden Region des *flk-1* Gens in Kombination mit einem 2.3 kbp Fragment aus dem ersten Intron des Gens die Reporterexpression endothelzellspezifisch reguliert werden (Kappel et al., 1999). Das erste der beiden Fragmente umspannt den Bereich von -640 bp bis +299 bp des *flk-1* Gens und wird in dieser Arbeit als Promotor bezeichnet, das zweite umfasst den +1677 bis +3947 bp-Bereich und wird als Enhancer bezeichnet (*flk-1p/e*). Alle Angaben beziehen sich auf die Basenpaare relativ zum Transkriptionsstart. Zur vereinfachten Generierung der DNA-Konstrukte pFlk-1-Lodavin und pFlk-1-Scavidin wurde zunächst das pFlk-1-LacZ5 Plasmid (Kappel et al., 1999) mit einer „multiple-cloning-site“ (MCS) ausgestattet. Hierzu wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* verdaut und damit die LacZ-Kassette entfernt. Die komplementären MCS-enhaltenen Oligonukleotide wurden mit überhängenden Schnittstellen für die beiden Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* synthetisiert, so dass diese nach Hybridisierung direkt für die Insertion in den Vektor verwendet werden konnten.

Zur Klonierung des DNA-Konstrukts pFlk-1-Lodavin wurde das *Lodavin* Gen aus dem Plasmid pHTT631 (von S. Ylä-Herrtuala zur Verfügung gestellt) mittels der Restriktionsendonuklease *BamHI* geschnitten und in den Klonierungsvektor pKSII(+) (Stratagene) subkloniert. Schließlich wurde das *HindIII/NotI*-Fragment aus pKS-Lodavin in die entsprechenden Schnittstellen des Flk-1-MCS Vektor inseriert. Um Scavidin unter die Kontrolle des *flk-1* Promotors und Enhancers zu klonieren, wurde die cDNA mittels der Restriktionsendonuklease *PstI* aus dem retroviralen Konstrukt pLScARNL (Lehtolainen et al., 2002) geschnitten und in den Vektor pKSII(+) subkloniert. Schließlich

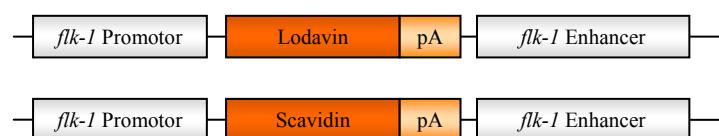


Abb. III.1.1 Schematische Darstellung der Konstrukte Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin

Die Expression der Fusionsproteine Lodavin und Scavidin wurde von dem zuvor charakterisierten 939 bp Promotorfragment des murinen *flk-1* Gens in Kombination mit dem 2.3 kbp Enhancerfragment aus dem 1. Intron des Gens kontrolliert.

wurde das *HindIII/NotI*-Fragment aus pKS-Scavidin in die entsprechenden Schnittstellen von pFlk-1-MCS kloniert. Alle generierten Konstrukte wurden sequenzanalytisch überprüft.

Bereits zuvor wurde beobachtet, dass die verwendeten murinen *flk-1* Promotor- und Enhancerelemente in humanen Endothelzellen aktiv sind (R. Heidenreich, persönliche Mitteilung). Dementsprechend wurde die Funktionalität der Plasmide pFlk-1-Lodavin und pFlk-1-Scavidin (Abb. III.1.1) durch transiente Transfektion der immortalisierten humanen Endothelzelllinie HUE überprüft. Um die Bindungsaktivität der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden zwei Tage nach Transfektion die Zellen mit dem biotinylierten Liganden Fluorescein (Pierce) inkubiert. Ungebundener Ligand wurde durch ausgiebiges Waschen der Zellen entfernt. Die Expression von Lodavin und Scavidin wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines Antikörpers gegen die Avidindomäne beider Fusionsproteine bestätigt (Abb. III.1.2 A/D). Darüber hinaus zeigte sich, dass ausschließlich Zellen zur Bindung des biotinylierten Liganden Fluorescein fähig waren, die die Fusionsproteine exprimierten (Abb. III.1.2 B/E). Eine unspezifische Bindung des

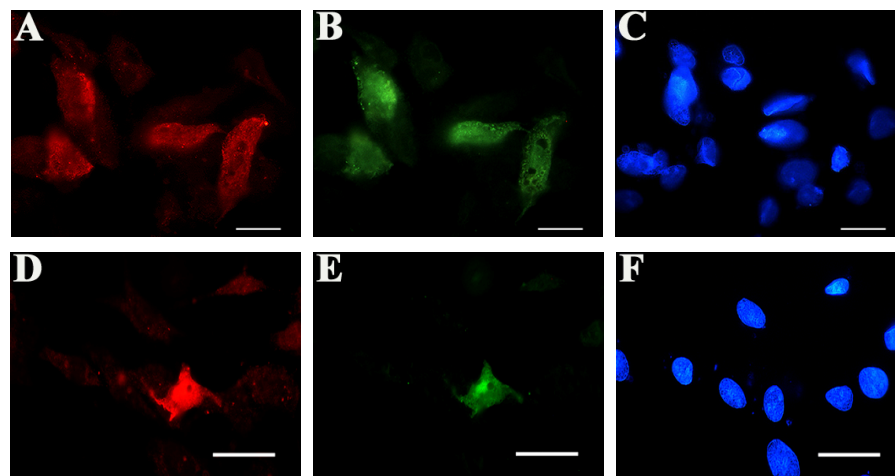


Abb. III.1.2 Endothelzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin *in vitro*

Spezifische Bindung eines biotinylierten Liganden. HUE Zellen wurden mit Lodavin (A-C) oder Scavidin (D-F) transient transfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine durchgeführt (A, D). Die Zellen wurden für 15 min mit biotinyliertem Fluorescein inkubiert. Zellen, die Lodavin oder Scavidin exprimierten, zeigten eine spezifische Bindung des biotinylierten Liganden (B, E). Eine unspezifische Bindung an nicht-transfizierte Zellen wurde nicht beobachtet. Hoechst 333.42 Färbung der Zellkerne (C, F).

Balken: 20µm

Liganden an nicht-transfizierte Zellen konnte nicht beobachtet werden. Somit wurde die Funktionalität der Plasmide pFlk-1-Lodavin und pFlk-1-Scavidin, die für die Generierung transgener Tiere verwendet werden sollten, *in vitro* bestätigt. Die Bindungsaktivität der Fusionsproteine konnte in Endothelzellen demonstriert werden.

Um auszuschließen, dass die endothelzellspezifische Expression von Lodavin oder Scavidin während der Embryonalentwicklung zu phänotypischen Veränderungen oder zur Letalität führt, wurden Embryonen untersucht, die sich direkt durch Pronukleusinjektion der DNA und anschließend Oozytentransfer entwickelten. Grund der Annahme war, dass endogenes Serumbiotin durch Lodavin bzw. Scavidin internalisiert wird, so dass ein erhöhter intrazellulärer Biotingehalt der Endothelien Einfluss auf die Ausbildung des Gefäßsystems während der Embryonalentwicklung nehmen könnte. Die Analyse erfolgte an Tag 11,5 der Embryonalentwicklung (E11,5). Hierzu wurden die Dottersäcke der Embryonen mittels PCR-Analyse hinsichtlich ihrer Transgenität untersucht und die transgenen Embryonen histologisch analysiert. In zwei von drei transgenen Embryonen wurde eine endothelzellspezifische Expression von Lodavin nachgewiesen. Keiner der untersuchten transgenen Embryonen wies im Vergleich mit Embryonen aus Wildtyp Mäusen morphologische Unterschiede in Größe und Entwicklung auf. Es wurde kein abnormaler vaskulärer Phänotyp beobachtet (Daten nicht gezeigt). Folglich wurden die Plasmide zur Generierung transgener Mauslinien verwendet. Einen Überblick der Daten zur Generierung und Analyse der transgenen Tiere zeigt Tabelle III.1. Die Generierung transgener Mäuse erbrachte 77 Flk-1-Lodavin bzw. 97 Flk-1-Scavidin Nachkommen. Diese wurden mittels PCR-Analyse aus genomischer DNA von Schwanzbiopsien genotypisch untersucht. Auf diese Weise wurden 5 Tiere zur Gründung Flk-1-Lodavin transgener Mauslinien bzw. 6 Tiere zur Generierung Flk-1-Scavidin transgener Linien

	Flk-1-Lodavin	Flk-1-Scavidin
Anzahl der Embryonen aus Oozytentransfer	51	-
Anzahl der positiven Embryonen aus Genotypisierung von Dottersack DNA	3	-
Anzahl transgenexprimierender Embryonen	2	-
Anzahl der Nachkommen aus Oozytentransfer	77	97
Anzahl der positiven Nachkommen durch Genotypisierung von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien	5	6
Anzahl der transgenexprimierenden Nachkommen/Gründer einer Linie	1	1

Tab. III.1 Übersicht der Analysen zur Generierung transgener Tiere

ermittelt. Damit waren für beide Konstrukte ca. 6% der Nachkommen positiv für das Transgen. Im Weiteren wurden diese so genannten Gründer einer Linie mit Wildtyp Tieren des Stammes C57/BL6 gekreuzt, deren Nachkommen somit heterozygot für das Transgen waren. Die aus den Verpaarungen hervorgegangenen Embryonen wurden routinemäßig am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung (E11,5) hinsichtlich der Expression des Transgens untersucht. Hierzu wurden die Dottersäcke der Embryonen mittels PCR-Analyse genotypisiert und die transgenen Embryonen immunhistologisch untersucht. Für die Gene *Lodavin* und *Scavidin* wurde jeweils eine Linie ermittelt, deren Nachkommen während der Embryonalentwicklung die Expression des Transgens reproduzierbar im Endothel aufwiesen. Dabei gaben der Gründer der Linie Flk-1-*Lodavin* und der Gründer der Linie Flk-1-*Scavidin* das Transgen nach den Mendelschen Gesetzen an ihre Nachkommen weiter.

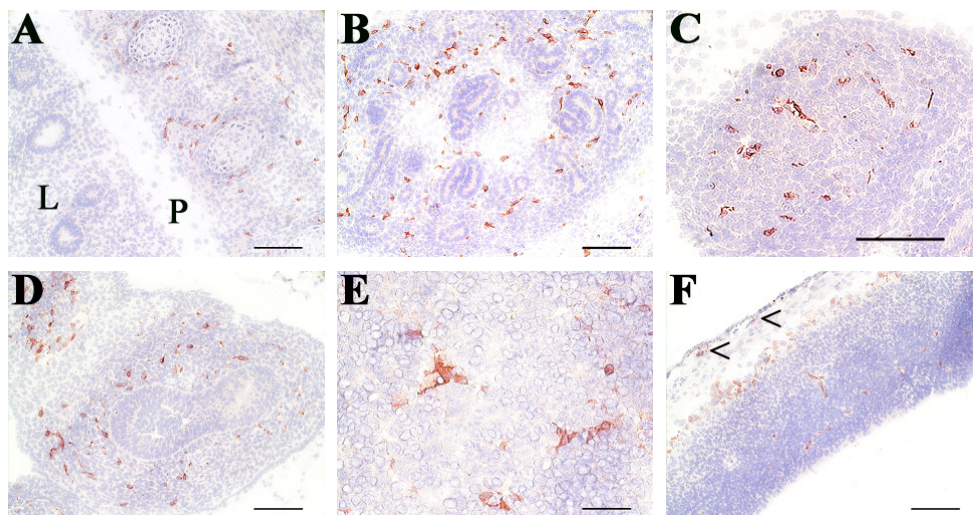


Abb. III.1.3 Immunhistochemische Färbung Flk-1-*Lodavin* transgener Embryonen

Flk-1-*Lodavin* transgene Embryonen der Linie 29107 wurden an E14,5 präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und immunhistochemische Färbungen gegen die Avidindomäne von *Lodavin* durchgeführt. **A.** Während Intercostalgefäße *Lodavin* exprimierten, wurden in der Lunge keine *Lodavin* positiven Gefäße detektiert. **B.** Gefäße der Niere exprimierten *Lodavin*. **C.** In der Nebenniere wurden *Lodavin* positive Gefäße detektiert. **D.** Gefäße des Darms wiesen eine *Lodavin* Expression auf. **E.** In der Leber exprimierten Endothelzellen *Lodavin*. **F.** *Lodavin* positive Gefäße im perineuralen vaskulären Plexus und Neuroektoderm. Die Kapillaren der Haut waren ebenso gefärbt (Pfeilspitzen).

Balken: 100 µm in A, B, C, D, F, 50 µm in E, (L) Lunge, (P) Pleuraraum

Im Folgenden wurden die transgenen Embryonen beider Linien charakterisiert, die aus Verpaarungen der Gründer oder deren Nachkommen mit Wildtyp Tieren hervor gingen. Da Gründer einer Linie als die F₀-Generation bezeichnet werden, handelt es sich bei den untersuchten Embryonen um Tiere der F₁ bis F₃-Generation. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Avidindomäne wurde die endothelzellspezifische Expression von Lodavin in fast allen Organen während der Embryonalentwicklung an Tag 14,5 (E14,5) nachgewiesen (Abb. III.1.3). Einzige Ausnahme war die Lunge (Abb. III.1.3 A). Während Intercostalgefäße eine deutliche Reaktivität gegenüber Lodavin aufwiesen, wurde bei keinem der untersuchten Embryonen im Lungengewebe eine Lodavinexpression beobachtet. Gefäße der Niere (Abb. III.1.3 B) und Nebenniere (Abb. III.1.3 C) sowie des Darms (Abb. III.1.3 D) waren Lodavin positiv. Ebenso wurde in Endothelien der Leber die Expression von Lodavin nachgewiesen (Abb. III.1.3 E). Der Schnitt durch die Kopfregion eines Embryos zeigt den perineuralen vaskulären Plexus sowie von dort in das Neuroektoderm aussprossende Gefäße. Diese, wie auch kleinste Kapillaren der Haut, zeigten eine Lodavin-Expression (Abb. III.1.3 F).

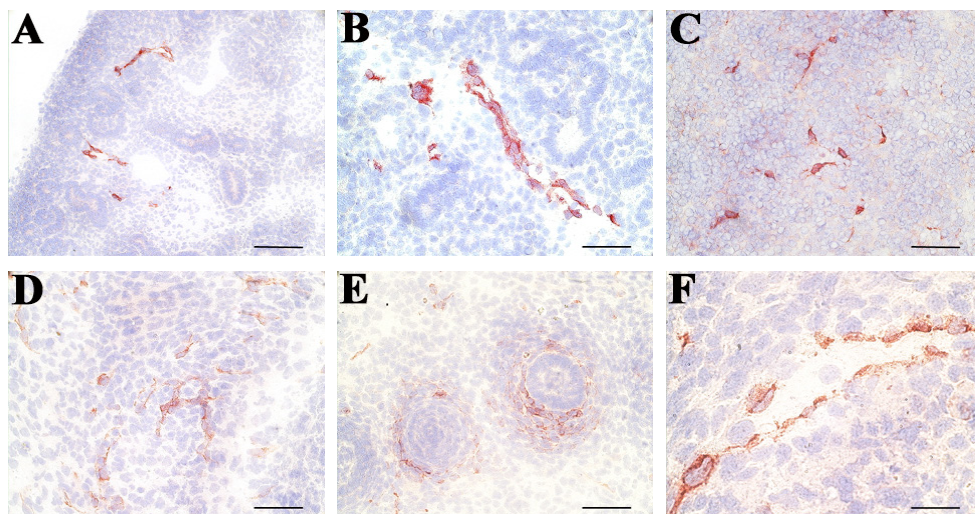


Abb. III.1.4 Immunhistochemische Färbung Flk-1-Scavidin transgener Embryonen

Flk-1-Scavidin transgene Embryonen der Linie 31222 wurden an E15,5 präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und immunhistochemische Färbungen gegen die Avidindomäne von Scavidin durchgeführt. **A.** Gefäße der Niere exprimierten Scavidin. **B.** Blutgefäße der Lunge zeigten eine Expression von Scavidin **C.** In der Leber exprimierten Endothelzellen Scavidin. **D.** Gefäße des Neuroektoderm waren Scavidin positiv. **E.** Gefäße um die Haarfollikel exprimierten Scavidin. **F.** Querschnitt durch ein Gefäßlumen. Die innerste Endothelzellschicht ist Scavidin positiv.

Balken: 100 µm in A, 50 µm in B, C, D, E, 20 µm in F

Immunhistochemische Analysen von Embryonen der Flk-1-Scavidin Linie 31222 an Tag E15,5 bestätigten in allen embryonalen Organen einschließlich der Lunge eine endothelzellspezifische Expression von Scavidin (Abb. III.1.4). So wiesen Gefäße der Niere (III.1.4 A), der Lunge (Abb. III.1.4 B) sowie der Leber (Abb. III.1.4 C) eine Expression von Scavidin auf. Gefäße des Neuroepithels (Abb. III.1.4 D) wie auch Gefäße lokalisiert um Haarfollikel im Bereich der Schnauze (Abb. III.1.4 E) waren Scavidin positiv. Die stärkere Vergrößerung eines Gefäßlumens im Querschnitt zeigt, dass nur die innerste Endothelzellschicht eine Expression für Scavidin aufwies, während anliegende Perizyten negativ waren (Abb. III.1.4 F).

Die endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine während der Embryonalentwicklung transgener Mäuse wurde durch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt. Hierzu wurden neben dem spezifischen Antikörper gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine monoklonale Antikörper gegen die Endothelzellmarker Flk-1 und PECAM-1 verwendet. Die Überlagerung der Färbungen am Beispiel des Darmgewebes Lodavin-transgener Embryonen bzw. des Lungengewebes Scavidin-transgener Embryonen bestätigte eine Co-Lokalisation der Fusionsproteine beider Linien mit den Endothelzellmarkern (Abb. III.1.5). Dabei wurde eine Expression von Lodavin in 45-60 % der Flk-1 bzw. PECAM-1 positiven Gefäßen gefunden, während in Flk-1-Scavidin transgenen Embryonen die Scavidin Expression in 35-50 % aller Flk-1 bzw. PECAM-1 positiven Gefäße nachzuweisen war.

Im Weiteren wurden Organe adulter Tiere beider Linien hinsichtlich der Transgenexpression untersucht. In adulten Flk-1-Scavidin transgenen Mäusen wurde keine Expression des Transgens nachgewiesen. Die histologischen Untersuchungen von Gewebeschnitten der Milz, Niere, Leber, Lunge, Darm, Herz, Thymus und der Ovarien mit Uterus fielen negativ aus. Auch in Flk-1-Lodavin transgenen adulten Mäusen waren weitgehend alle Gefäße der analysierten Organe negativ. Einzige Ausnahme war das Gefäßsystem der Milz. Hier zeigte sich eine Expression des Fusionsproteins vor allem in Gefäßen der roten Pulpa, während solche der Milzfollikel negativ waren. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen den Endothelzellmarker Flk-1 und gegen die Avidindomäne von Lodavin bestätigten eine Transgenexpression in ca. 70 % aller Flk-1 positiver Gefäße (Abb. III.1.6 A-C).

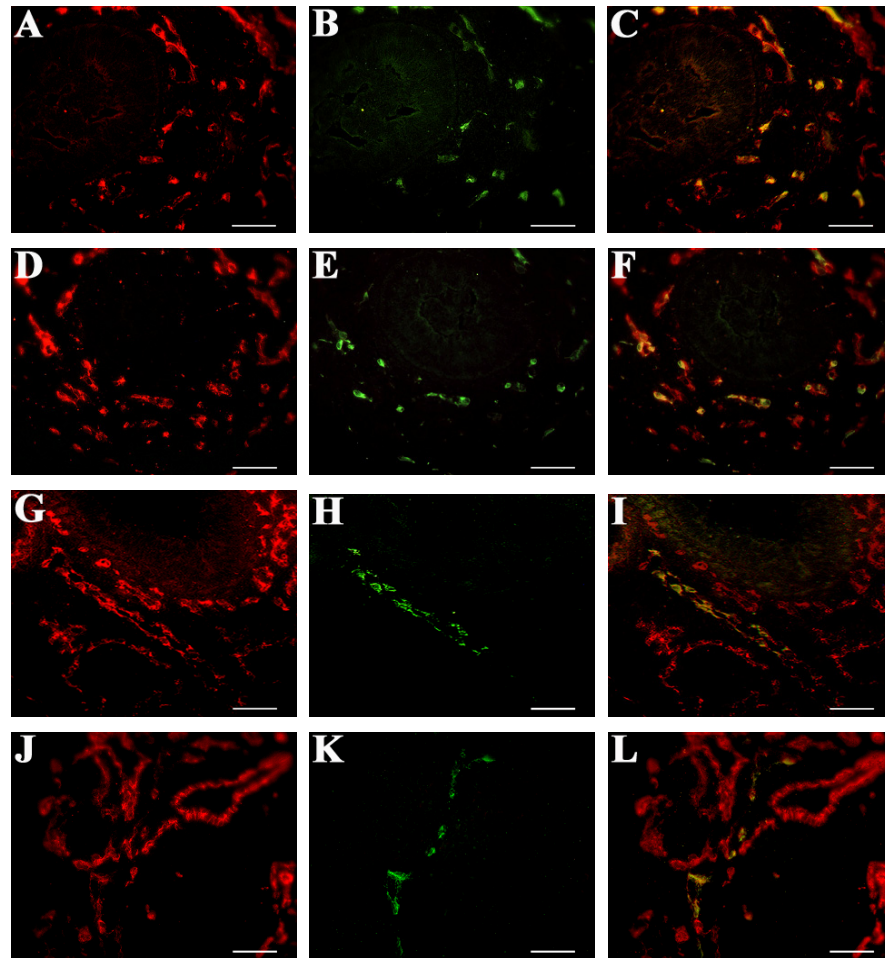


Abb. III.1.5 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgener Embryonen

Flk-1-Lodavin (A-F) und Flk-1-Scavidin (G-L) transgene Embryonen wurden präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und Immunfluoreszenzfärbungen gegen Flk-1 (A, G), PECAM-1 (D, J) sowie gegen die Avidindomäne von Lodavin (B, E) und Scavidin (H, K) durchgeführt. **A-F.** Gefäße des Darms Flk-1-Lodavin transgener Embryonen zeigten Flk-1 (A) und PECAM-1 (D) Reaktivität. Die Lodavin Immunfärbung war mit Gefäßstrukturen assoziiert (B, E). Die Überlagerung der Färbungen zeigte eine Co-Lokalisation von Lodavin in einem Teil der Flk-1 positiven Gefäße (C). Ebenso konnte Lodavin in einigen der PECAM-1 positiven Gefäße lokalisiert werden (F). **G-L.** Gefäße der Lunge Flk-1-Scavidin transgener Embryonen waren Flk-1 (G) und PECAM-1 (J) positiv. Scavidin Reaktivität war mit gefäßartigen Strukturen assoziiert (H, K). Die Überlagerung der Färbungen bestätigte, dass Scavidin in einem Teil der Flk-1 positiven Gefäße exprimiert wurde (I). Auch wurde eine Co-Lokalisation von Scavidin in einigen der PECAM-1-exprimierenden Gefäße gefunden.

Balken: 50 μ m, A-F: E14.5, G-L: E15.5

Zusätzlich wurden Bilder mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Färbungen am Querschnitt eines Gefäßes der Milz demonstrierten, dass ausschließlich die innere Endothelzellschicht eine Lodavin Expression aufwies und dass das Fusionsprotein an der Zelloberfläche lokalisiert war. Die Expression war nicht gerichtet und trat zur luminalen wie auch abluminalen Seite der Endothelzelle gleichmäßig auf (Abb. III.1.6 D). Ferner wurde die Co-Lokalisation von Lodavin mit dem Endothelzellmarker PECAM-1 bestätigt (Abb. III.1.6 F). Nicht alle der PECAM-1 positiven Endothelzellen des Gefäßanschnitts wiesen eine Expression des Transgens auf (Pfeil). Die Expression des Fusionsproteins im Gefäßsystem der Milz adulter Tiere könnte auf die verwendeten *flk-1* genregulatorischen Elemente in Kombination mit dem Integrationsort zurückzuführen sein. So zeigten die in vorherigen Arbeiten generierten und analysierten Flk-1-LacZ transgenen Mauslinien ebenso eine Reportergenexpression in Milzgefäßen adulter Tiere (Kappel et al., 1999).

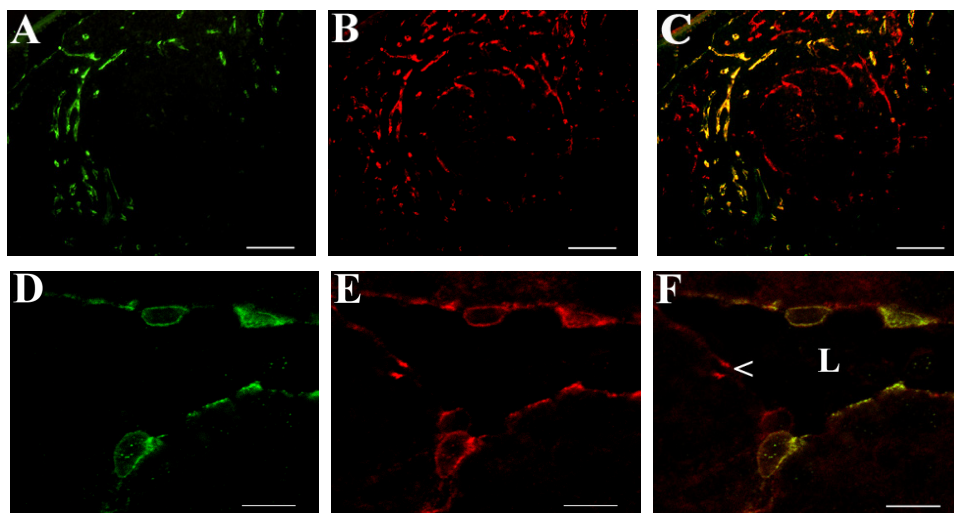


Abb. III.1.6 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung der Milz Flk-1-Lodavin transgener Mäuse

Organe Flk-1-Lodavin adulter Tiere wurden präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und Immunfluoreszenzfärbungen gegen die Avidindomäne von Lodavin (A, D) sowie gegen Flk-1 (B) und PECAM-1 (E) durchgeführt. A-C. Lodavin Reaktivität war mit Gefäßstrukturen der roten Pulpa assoziiert (A), wie der Vergleich der Flk-1 Expression im Gefäßsystem der Milz zeigte (B). Die Überlagerung der Färbungen zeigte eine Co-Lokalisation von Lodavin mit einem Großteil der Flk-1 positiven Gefäße (C). D-F. Querschnitt durch ein Gefäßlumen der Milz. Die Endothelzellen waren positiv für PECAM-1 (E) und zeigten auf der Zelloberfläche eine Lodavin Reaktivität (D). In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Überlagerung der Expression von PECAM-1 mit Lodavin bestätigt (F). Nicht alle Endothelzellen des Gefäßanschnitts zeigten eine Co-Expression (Pfeilspitze).

Balken: 50 µm in A-C, 8 µm in D-F, L = Lumen

Bereits zuvor wurde in experimentellen Tumormodellen gezeigt, dass die verwendeten *flk-1* Promoter- und Enhancerelemente nicht nur während der Gefäßneubildung im Embryo sondern auch während des Prozesses der Tumorangiogenese aktiv sind (Heidenreich et al., 2000). Nach subkutaner Injektion verschiedener syngener Tumorzelllinien in Flk-1-LacZ transgene Mäuse wurde eine Reportergenexpression in Endothelzellen des Tumorgewebes nachgewiesen. Diese trat unabhängig von der Art des Tumors auf. Dementsprechend wurden die in dieser Arbeit generierten und charakterisierten Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgenen Mauslinien hinsichtlich ihrer Transgenexpression im Tumorendothel untersucht. BFS-1 Fibrosarkoma Zellen, die syngen zum C57/BL6 Hintergrund der transgenen Mäuse sind, wurden 10-16 Wochen alten transgenen Mäusen der F₂-F₄ Generation und Wildtyp Tieren zur Kontrolle subkutan transplantiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorzellinokulation wurden die Tier durch zervikale Dislokation getötet, die Tumoren entnommen, gewogen und untersucht. Aus Tumorlysaten an Tag 7 nach Transplantation wurde die RNA isoliert, revers transkribiert (RT-Reaktion) und die Transgene Lodavin und Scavidin unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert (Abb. III.1.7). Zum Vergleich der Ergebnisse wurde das Amplifikat des Haushaltgens GAPDH mitgeführt. In 80-90% der Tumoren, die sich in transgenen Mäusen entwickelten, konnte die Expression der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten Lysate von Tumoren aus Wildtyp Tieren.

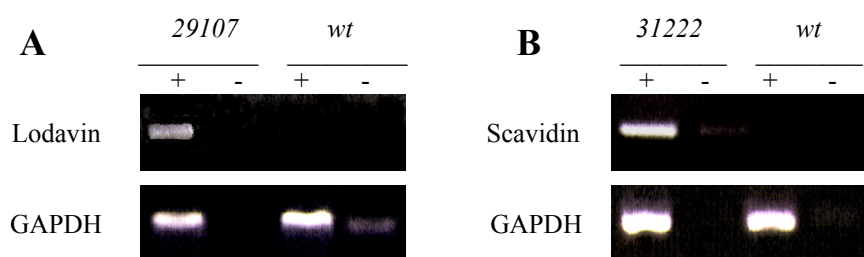


Abb. III.1.7 Lodavin und Scavidin Expression in BFS-1 Fibrosarkomen

Reverse-Transkriptase (RT)-PCR zum Nachweis der Lodavin und Scavidin Expression. BFS-1 Fibrosarkome wurden subkutan Flk-1-Lodavin (29107), Flk-1-Scavidin (31222) und Wildtyp Tieren (wt) injiziert. 7 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und die RNA isoliert. Eine RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den Nachweis von Lodavin (A) und Scavidin (B) wurde durchgeführt (+) und eine Kontrolle ohne RT (-) mitgeführt, um Kontaminationen genomischer DNA auszuschließen. Eine PCR von GAPDH diente als Kontrollreaktion.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation wurden Gefrierschnitte des Tumorgewebes angefertigt und immunhistochemisch untersucht. Hierbei wurden Antikörper gegen die Avidindomäne der Lodavin- und Scavidinproteine verwendet. Zur Darstellung der Tumorgefäße wurden an Parallelschnitten Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Endothelzellmarker Flk-1 und PECAM-1 durchgeführt. In beiden Linien entwickelten sich gut vaskularisierte Tumoren, wie die Färbungen der Endothelzellmarker zeigten (Abb. III.1.8 A/B, D/E). Eine gefäßassoziierte Expression von Lodavin und Scavidin wurde in 50-65% der analysierten Tumoren bestätigt (Abb. III.1.8 C/F) und war vornehmlich in peripheren Bereichen des Tumors lokalisiert. Mit fortgeschrittenem Tumorwachstum nahm die Expression der Transgene beider Linien ab. Während an Tag 7 nach Transplantation die Expression nur leicht abgeschwächt war, wurde diese an Tag 14 nur noch in vereinzelt Gefäßen des Tumorgewebes nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Zu keinem der Zeitpunkte, an denen die Tumoren histologisch analysiert wurden, konnten hinsichtlich der Ausbildung von Tumorgefäßen, deren Dichte oder Morphologie signifikante Unterschiede zu Kontrolltumoren beobachtet werden. Um die endothelzellspezifische Expression der Transgene zu bestätigen, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine bzw. gegen Flk-1 und PECAM-1 durchgeführt. Die Überlagerung der Färbungen zeigte in 10-15% aller Tumorgefäße eine Expression von Lodavin in Co-Lokalisation mit beiden Endothelzellmarkern (Abb. III.1.8 G-L). Mittels Immunfluoreszenzfärbungen war Scavidin nicht nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die schwächere Expression von Scavidin im Vergleich zu Lodavin sein, die auf den Integrationsort des Transgens im Genom oder auf Unterschiede der intrazellulären Prozessierung beider Proteine beruht.

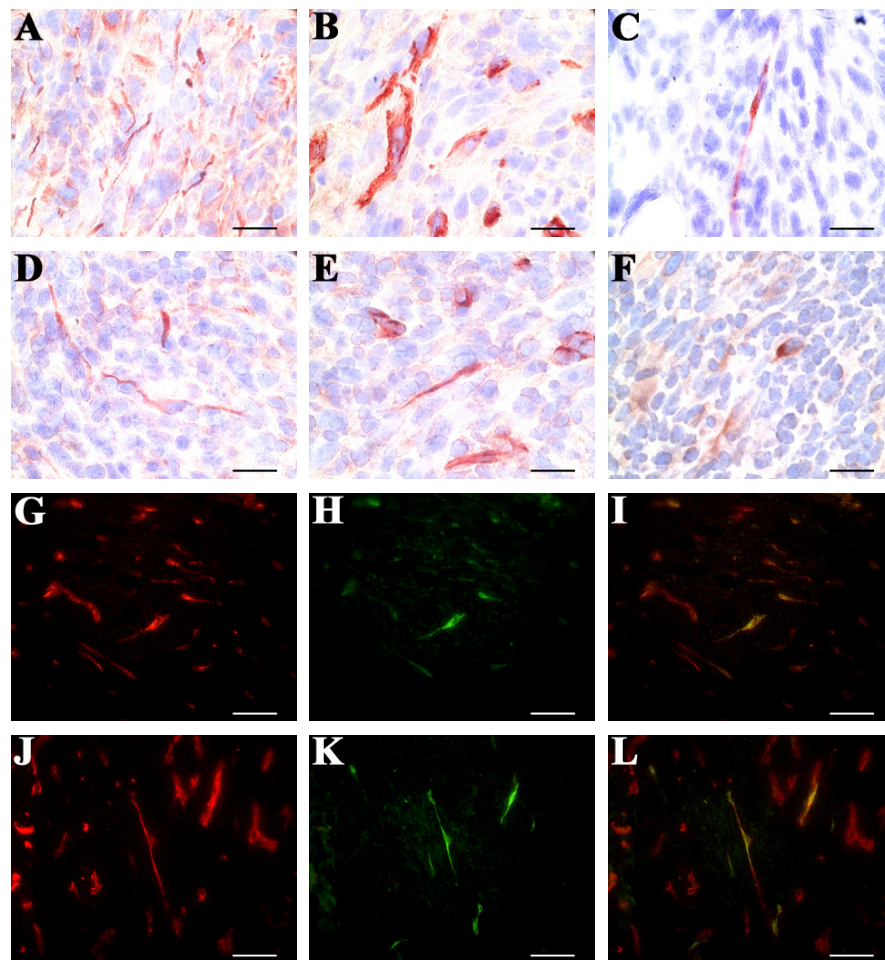


Abb. III.1.8 Endothelzellspezifische Lodavin und Scavidin Expression in BFS-1 Fibrosarkomen

1,5x10⁶ BFS-1 Fibrosarkome wurden adulten Flk-1-Lodavin (A-C, G-L) und Flk-1-Scavidin (D-E) transgenen Tieren subkutan injiziert. 4 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und Gefrierschnitte angefertigt. Immunhistochemische Färbungen (A-F) und Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen (G-L) wurden gegen Flk-1, PECAM-1 und die Avidindomäne von Lodavin und Scavidin angefertigt. **A-C.** Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren zeigten eine spezifische FLk-1 (A) und PECAM-1 (B) Färbung der Tumorgefäße und eine gefäßassoziierte Färbung gegen Lodavin (C). **D-F.** Tumoren aus Flk-1-Scavidin transgenen Tieren waren gut vaskularisiert, wie anhand der Flk-1 (D) und PECAM-1 (E) Färbung gezeigt. Scavidin Reaktivität wurde in einigen Gefäßstrukturen gefunden (F). **G-L.** Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren zeigten eine spezifische Flk-1 (G) und PECAM-1 (J) Färbung tumoraler Gefäße und eine gefäßassoziierte Färbung gegen Lodavin (H, K). Die Überlagerung der Färbungen zeigte, dass Lodavin Expression co-lokalisiert in einigen der Flk-1 (I) bzw. PECAM-1 positiven Gefäße auftrat (L).

Balken: 50 μm

Das Gewicht der Tumoren wurde an Tag 7 und Tag 14 nach Tumorzellinokulation bestimmt und statistisch ausgewertet. Einen Überblick der ermittelten Daten zu den angegebenen Zeitpunkten gibt Abb. III.1.9. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt. Vergleicht man das mittlere Gewicht der Tumoren an Tag 7 nach Tumorzelltransplantation, so war kein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum der drei Gruppen zu beobachten. Die berechneten Mittelwerte waren für BFS-1 Fibrosarkome aus Wildtyp Tieren (50 (± 30) mg) oder Flk-1-Scavidin transgenen Tieren (51 (± 35) mg) in etwa gleich. Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren wichen mit einem mittleren Gewicht von 62 (± 34) mg nicht signifikant von Kontrolltumoren ab. An Tag 14 nach Tumorzellinokulation war das Tumorwachstum der Flk-1-Lodavin Gruppe im Vergleich zu beiden anderen Gruppen signifikant verstärkt (Abb. III.1.9 und Abb. III.1.10). Das mittlere Gewicht der Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Mäusen lag bei 255 (± 157) mg im Vergleich zu 100 (± 127) mg der Kontrollgruppe. Damit wiesen Tumoren, die im Endothel spezifisch Lodavin exprimierten, durchschnittlich eine ca. 2,5-fache Gewichtszunahme auf ($p < 0,01$). Das mittlere Gewicht der Tumoren, die in Flk-1-Scavidin transgenen Tieren heranwuchsen, lag bei 93 (± 163) mg und entsprach dem der Kontrolltumoren. Eine mögliche Erklärung für diesen signifikanten Unterschied im Tumorwachstum könnte die stärkere Expression von Lodavin im Tumorendothel sein. In wieweit die Expression von Lodavin zu einer erhöhten lokalen Biotinkonzentration im Tumorgewebe führt und Einfluss auf das Tumorwachstum nimmt, bleibt abzuklären.

Tier	7 Tage				14 Tage			
	n	x	SD	SE	n	x	SD	SE
wildtyp	18	50	30	7	12	100	127	36
Scavidin	18	51	35	8	12	93	163	29
Lodavin	18	62	34	16	12	255	157	45

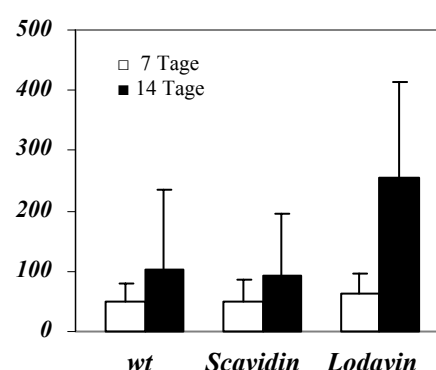


Abb. III.1.9 Übersicht der Tumorgewichte [mg] an Tag 7 und 14 p.i.

$1,5 \times 10^6$ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden adulten Wildtyp (*wt*), Flk-1-Scavidin (*Scavidin*) oder Flk-1-Lodavin (*Lodavin*) Tieren subkutan injiziert. 7 und 14 Tage p.i. wurden die Tumoren entnommen und das Gewicht [mg] bestimmt. Nach 14 Tagen war eine signifikante Gewichtszunahme der Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren zu erkennen ($p < 0,01$). (n) Anzahl der Tumoren je Gruppe, (x) Mittelwert der Tumorgewichte in mg, (SD) Standardabweichung, (SE) Standardfehler

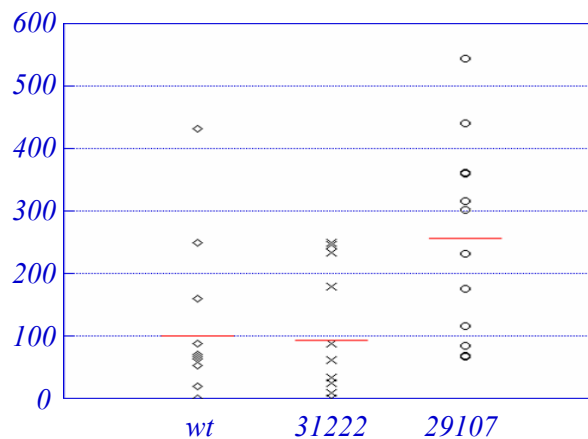


Abb. III.1.10 Wachstum subkutaner BFS-1 Fibrosarkome 14 Tage p.i.

$1,5 \times 10^6$ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden adulten Wildtyp (*wt*), Flk-1-Scavidin (31222) oder Flk-1-Lodavin (29107) Tieren subkutan injiziert. 14 Tage p.i. wurden die Tumoren entnommen und das Gewicht [mg] bestimmt. Deutlich war eine signifikante Gewichtszunahme bei Tumoren aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren zu erkennen ($p < 0,01$).

III.1.1.2 Endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine im Wildtyp Tier

Im zweiten Ansatz sollte eine spezifische Expression der Fusionsproteine Lodavin und Scavidin im Tumorendothel von Wildtyp Mäusen erzielt werden. Dies umfasste die Generierung ecotroper Retroviren, die den Gentransfer *in vivo* vermitteln. Zur Herstellung des retroviralen Konstruktes wurde die cDNA von Lodavin aus dem Plasmid pKS-Lodavin mittels der Restriktionsendonuklease *BamHI* isoliert und das Fragment in die entsprechende Schnittstelle des pLXSN-Vektors (BD Biosciences) kloniert. Mittels der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* wurde die cDNA von Scavidin aus dem Plasmid pKS-Scavidin isoliert. Die Ligation des Fragmentes erfolgte in die entsprechenden Schnittstellen des retroviralen Plasmids. Die Aktivität der Konstrukte pLXSN-Lodavin und pLXSN-Scavidin wurde nach transienter Transfektion der Affen-Nieren-Zelllinie COS-1 durch eine Immunfluoreszenzfärbung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur Generierung Lodavin- bzw. Scavidin-codierender Retroviren wurden die Konstrukte in die Verpackungszelllinie GP+E86 transfiziert und anschließend durch Kultivierung in Neomycin-haltigem Medium auf stabile Vektorintegration selektioniert. Für jedes Konstrukt wurden 35 Klone isoliert, die mit GP+E86/Lodavin #1-35 bzw. GP+E86/Scavidin #1-35 benannt wurden.

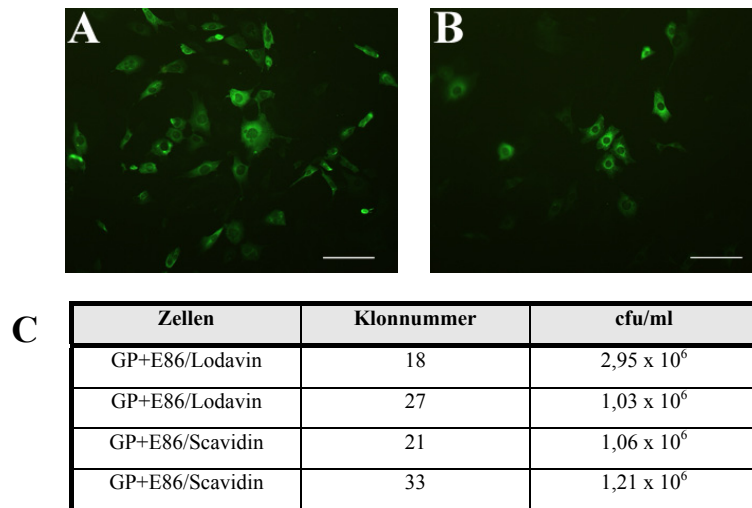


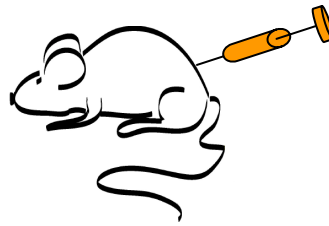
Abb. III.1.11 Analyse virusproduzierender GP+E86/Lodavin und GP+E86/Scavidin Zellen

GP+E86 Zellen wurden mit dem pLXSN-Lodavin bzw. pLXSN-Scavidin Konstrukt transfiziert und zur Selektion auf stabile Vektorintegration in Neomycin-haltigem Medium kultiviert. Der Nachweis der Lodavin (**A**) bzw. Scavidin (**B**) Expression erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine. **C**. Bestimmung des Virustiters in Medienüberständen von GP+E86/Lodavin bzw. GP+E86/Scavidin Zellen durch Infektion von NIH 3T3 Zellen. (cfu) „colony forming units“ = koloniebildene Einheiten; Balken: 100 μ m

Alle Klone wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Avidindomäne beider Fusionsproteine untersucht. In ungefähr 50% der selektionierten Klone wurde eine Expression von Lodavin bzw. Scavidin nachgewiesen (Abb. III.1.11 A/B). Da im Folgenden die Klone für *in vivo* Versuche verwendet wurden, wurde deren Virustiter durch Infektion der Zielzelllinie NIH 3T3 bestimmt. Der GP+E86/Lodavin Klon mit der Nummer 18 wies den höchsten Virustiter auf (Abb. III.1.11 C). Es wurden ca. 3×10^6 infektiöse Viruspartikel pro Milliliter Zellkulturüberstand bestimmt. Da der Virustiter für die GP+E86/Scavidin Klone deutlich niedriger war und zudem publiziert wurde, dass die Prozessierungs- und Bindungseigenschaften von Lodavin denen von Scavidin überlegen sind (Lehtolainen et al., 2002; 2003), wurden die *in vivo* Versuche experimenteller Tumoren ausschließlich mit dem GP+E86/Lodavin Klon #18 durchgeführt.

Die virusproduzierenden GP+E86/Lodavin Zellen wurden zu gleichen Teilen mit BFS-1 Fibrosarkoma Zellen gemischt und adulten Wildtyp Mäusen subkutan injiziert. Um auszuschließen, dass das Tumorwachstum durch das retrovirale Expressionsplasmid ausgelöste unspezifische Reaktionen beeinflusst wird, wurden Negativkontrollen

mitgeführt. Hierzu wurden BFS-1 und GP+E86 Zellen, die stabil den pLXSN Leervektor integriert hatten (GP+E86/empty) und über einen vergleichbaren Virustiter verfügten, co-injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Tumoren entnommen, gewogen und immunhistochemisch ausgewertet. Eine Übersicht des Versuchsablaufs gibt Abb. III.1.12. Zur Darstellung Lodavin positiver Strukturen wurde ein Antikörper gegen die Avidindomäne verwendet. Um Gefäße im Tumorgewebe darzustellen, wurden an Parallelschnitten monoklonale Antikörper gegen die Endothelzellmarker PECAM-1 und Flk-1 eingesetzt. Es entwickelten sich gut vaskularisierte Tumoren (Abb. III.1.13. A/B). In ca. 90% aller analysierten Tumoren wurde eine Expression von Lodavin in gefäßähnlichen Strukturen nachgewiesen, die sich deutlich von Tumorzellstrukturen unterschieden (Abb. III.1.13 C).



subkutane Co-Injektion der BFS-1 und GP+E86 Zellen
(je $1,5 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$ /Injektion)



Entnahme des Tumorgewebes
7 und/oder 14 Tage post Injektion



Bestimmung des Tumorgewichts
immunhistochemische Analyse an Gefrierschnitten
und/oder RT-PCR von Lysaten des Tumorgewebes

Abb.III.1.12 Fließschema des Versuchsablaufs

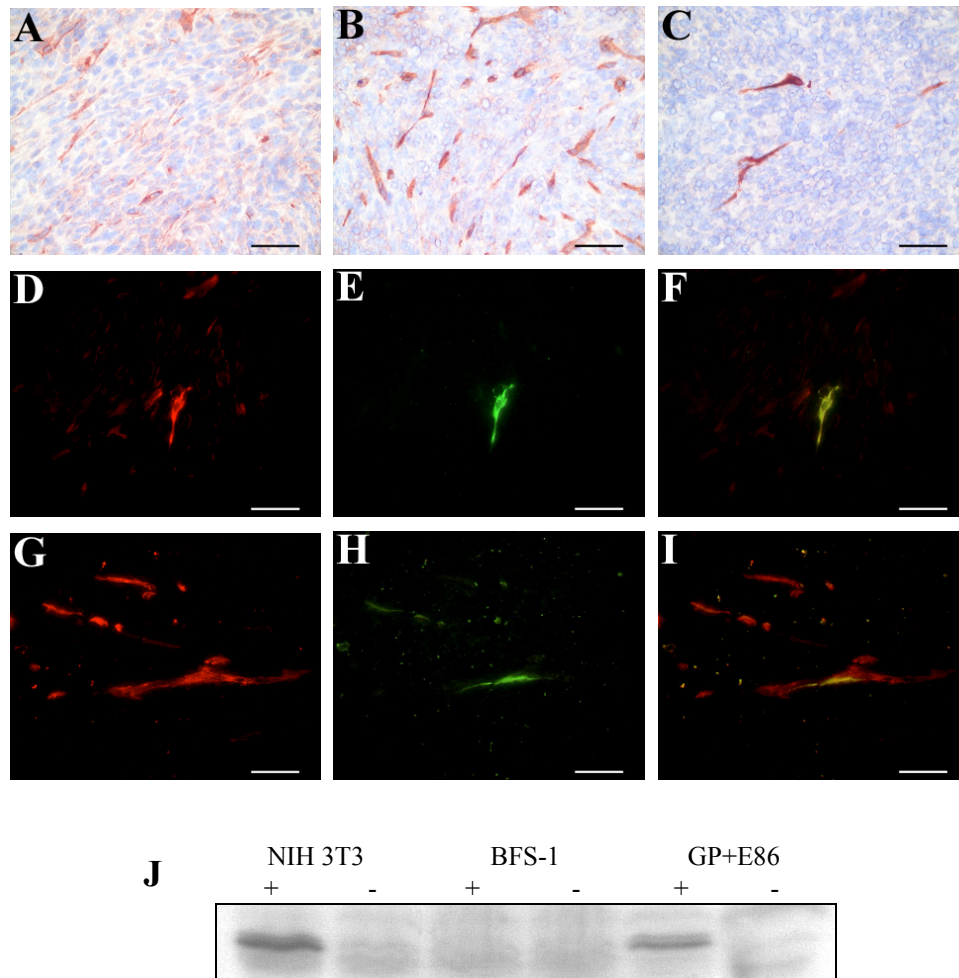


Abb. III.1.13 Endothelzellspezifische Lodavin Expression nach Co-Injektion von BFS-1 und GP+E86/Lodavin Zellen

$1,5 \times 10^6$ BFS-1 Zellen wurden mit gleicher Anzahl GP+E86/Lodavin Zellen adulten Wildtyp Mäusen subkutan co-injiziert. 14 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und Gefrierschnitte angefertigt. Immunhistochemische Färbungen (A-C) und Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen (D-I) wurden gegen Flk-1, PECAM-1 und die Avidindomäne von Lodavin angefertigt. A-C. Die Tumoren waren gut vaskularisiert, wie anhand der Flk-1 (A) und PECAM-1 (B) Färbung zu sehen. Zudem zeigte sich Lodavin Reaktivität in gefäßähnlichen Strukturen (C). D-I. Die Tumoren zeigten eine spezifische Flk-1 (D) und PECAM-1 (G) Färbung tumoraler Gefäße und eine gefäßassoziierte Expression von Lodavin (E, H). Die Überlagerung der Färbungen zeigte, dass Lodavin exklusiv co-lokalisiert in einigen der Flk-1 (F) bzw. PECAM-1 (I) positiven Gefäße auftrat. J. Western Blot Analyse. NIH 3T3 und BFS-1 Zellen wurden mit viralen Überständen der GP+E86/Lodavin (+) oder GP+E86/empty Zellen (-) inkubiert. Zwei Tage nach Infektion wurden aus den Zellen Proteinlysate hergestellt. Diese wurden mittels 12%iger SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulose Membran immobilisiert. Zur Detektion des Fusionsproteins wurde ein Antikörper gegen die Avidindomäne verwendet. Infizierte NIH 3T3 (+) sowie GP+E86/Lodavin (+) zeigten ein spezifisches Signal mit einer molekularen Masse von 65 kDa.

Balken: 50 μm

Um zu bestätigen, dass es sich bei den Lodavin positiven Strukturen um Blutgefäße handelt, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. In 10-15% aller Tumorgefäße wurde eine Co-Lokalisation der beiden Endothelzellmarker Flk-1 und PECAM-1 mit Lodavin beobachtet (Abb. III.1.13 D-I). Zusätzlich wurde *in vitro* mittels Western Blot Analyse bestätigt, dass BFS-1 Zellen im Gegensatz zu NIH 3T3 Zellen ein mittels retroviraler Infektion eingebrachtes Gen nicht exprimieren können. Das im Zellkulturüberstand von GP+E86 Zellen angesammelte Retrovirus ist aktiv und vermag die Zelllinie NIH 3T3 zu infizieren, die danach das heterologe Gen Lodavin exprimierte. BFS-1 Zellen hingegen zeigten nach Infektion keine Expression von Lodavin (Abb. III.1.13 J). Damit wurde erstmals gezeigt, dass der retrovirale Gentransfer während des Tumorwachstums von BFS-1 Fibrosarkomen ausschließlich zu einer endothelzellspezifischen Expression des heterologen Gens Lodavin führt. Die Tumorzellen dieses Systems sind nicht infizierbar bzw. sie sind nicht fähig, das eingebrachte Gen zu exprimieren.

Die statistische Auswertung der Tumorgewichte an Tag 14 nach Transplantation zeigte eine signifikante Zunahme des Tumorwachstums durch die Expression von Lodavin im tumoralen Gefäßsystem (Abb. III.1.14). Tumoren, die Lodavin endothelzellspezifisch exprimierten, lagen mit einem mittleren Gewicht von 275 (± 114) mg um das 2,5-fache über dem von Kontrolltumoren (108 (± 70) mg). Histologische Vergleiche der Tumoren beider Gruppen wiesen keine Unterschiede hinsichtlich Gewebemorphologie, Gefäßausbildung oder deren Dichte aus, die in Zusammenhang mit der Zunahme des Tumorgewichts und auch des Volumens (Daten nicht gezeigt) stehen könnten. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen aus transgenen Mäusen (siehe Abb. III.1.9 und III.1.10). In beiden Modellen führte die endothelzellspezifische Expression von Lodavin während des Wachstums von BFS-1 Fibrosarkomen zu einem signifikanten Anstieg der Tumorgroße und des -gewichts.

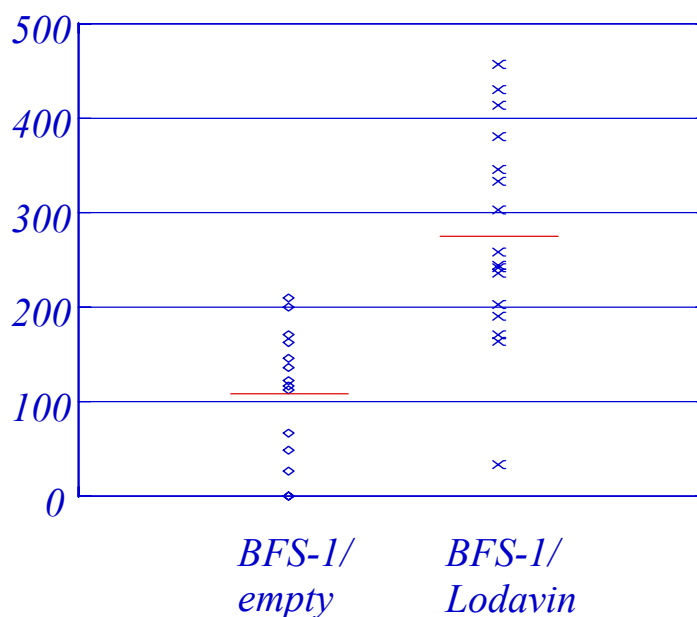


Abb. III.1.14 Wachstum subkutaner BFS-1 Fibrosarkome 14 Tage p.i.

$1,5 \times 10^6$ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden mit der gleichen Anzahl virusproduzierender GP+E86/empty oder GP+E86/Lodavin Zellen adulten Wildtyp Tieren subkutan injiziert. 14 Tage p.i. wurden die Tumoren entnommen und das Gewicht [mg] bestimmt. Deutlich war eine signifikante Gewichtszunahme der Tumoren zu erkennen, die Lodavin exprimieren ($p < 0,0001$).

III.1.2 Tumorzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin im Wildtyp Tier

Die tumorzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin erforderte die Etablierung stabil transfizierter BFS-1 Fibrosarkoma Zellklone. Zusätzlich sollte sich die Expression der Fusionsproteine durch Gabe eines Induktors regulieren lassen, wozu eine modifizierte Version des Tet-On Systems gewählt wurde (Abb. II.2).

Zur Generierung des Konstrukts prtTA-Lodavin wurde die cDNA von Lodavin mittels der Restriktionsendonuklease *BamHI* aus dem Plasmid pKS-Lodavin geschnitten. Das Plasmid prtTA (von H. Drexler zur Verfügung gestellt) wurde mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert. Die 5'Überhänge des Fragments und des linearisierten Vektors wurden mittels Klenow-Fragment der bakteriellen DNA-Polymerase I konvertiert und anschließend ligiert. Die codierende Sequenz für Scavidin wurde mittels der Restriktionsenzyme *SmaI/HincII* isoliert und schließlich in die konvertierte *EcoRI*-Schnittstelle des prtTA Plasmids ligiert. Die Aktivität der klonierten Plasmide prtTA-Lodavin und prtTA-Scavidin wurden durch transiente Transfektion in die Affen-Nieren-Zelllinien COS-1 und anschließende Immunfluoreszenzfärbung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur Generierung der Klone erfolgte nach Transfektion der Fibrosarkoma Zelllinie BFS-1 die Selektion auf stabile Vektorintegration in Puromycin-haltigem Wachstumsmedium. Für die Plasmide prtTA-Lodavin und prtTA-Scavidin wurden je 85-100 Klone selektioniert. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Avidindomäne beider Fusionproteine. Hierzu wurden die Klone zwei Tage vor der Färbung in Doxyzyklin-haltigem Medium kultiviert (2 µg/ml). Ungefähr 60 % der selektionierten Klone wiesen eine Induktion der Expression von Lodavin bzw. Scavidin in Gegenwart von Dox auf. Um zu bestätigen, dass die Expression regulierbar war, wurden die positiven Klone ohne Zugabe des Induktors kultiviert und erneut analysiert. Hierbei wurde beobachtet, dass ca. 85 % der Klone eine Hintergrundexpression aufwiesen. Von allen selektionierten Klonen wurden schließlich zwei ermittelt, nämlich BFS-1/Lodavin#21 und BFS-1/Scavidin#39, die zur regulierbaren Expression der Fusionsproteine in Abhängigkeit des Induktors Doxyzyklin fähig waren (Abb. III.1.15).

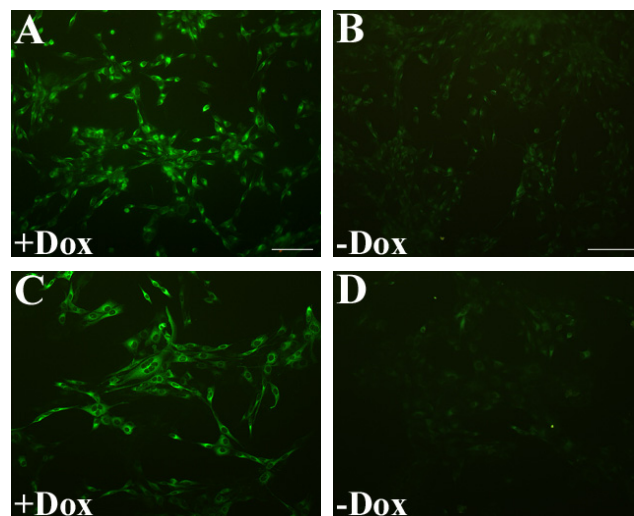


Abb. III.1.15 Tumorzellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin *in vitro*

BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden mit dem prtTA-Lodavin bzw. prtTA-Scavidin Konstrukt transfiziert und zur Selektion auf stabile Vektorintegration in Puromycin-haltigem Medium kultiviert. Zur regulierten Expression wurden die Zellen in 2 µg/ml Doxyzyklin-haltigem (+Dox) oder Doxyzyklin-freiem (-Dox) Medium kultiviert. Der Nachweis der Lodavin (A/B) bzw. Scavidin (C/D) Expression erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung mittels eines spezifischen Antikörpers gegen die Avidindomäne beider Fusionsproteine.

Balken: 100 µm

Im Folgenden sollte die regulierbare Expression der Gene Lodavin und Scavidin *in vivo* analysiert werden. Für die experimentellen Tumorversuche wurden adulte, 10-16 Wochen alte Wildtyp Tiere verwendet. Nicht-transfizierte BFS-1 Zellen wurden in zwei Kontrollgruppen (Gruppe I und II), Zellen der Klone BFS-1/Lodavin#21 bzw. BFS-1/Scavidin#39 in jeweils zwei Testgruppen (Gruppe III und IV) von Versuchstieren subkutan transplantiert. Je eine Kontroll- und eine Testgruppe (Gruppe II und IV) erhielt über einen Zeitraum von 14 Tagen Trinkwasser mit 100 µg/ml Dox. Tiere der Gruppen I und III bekamen zur Kontrolle Wasser ohne Zugabe von Dox. Eine Übersicht des Versuchsablaufs zeigt Abb. III.1.16. Nach 14 Tagen wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet, die Tumoren entnommen, gewogen und das Gewebe immunhistochemisch analysiert. Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper gegen die Avidindomäne der Fusionsproteine sowie zur Darstellung von Gefäßen ein monoklonaler Antikörper gegen den Endothelzellmarker PECAM-1 verwendet. Die Auswertung der BFS-1/Lodavin#21 Tumoren erbrachte, dass die tumorzellspezifische Expression von Lodavin durch Gabe von Dox *in vivo* nicht reguliert auftrat. Unabhängig vom Induktor wurde eine Expression des Fusionsproteins im Tumorgewebe der Fibrosarkome beobachtet (Daten nicht gezeigt). Analysen der Tumoren des Klons BFS-1/Scavidin#39 bestätigten eine regulierbare tumorzellspezifische Expression des Fusionsproteins (Abb. III.1.17).

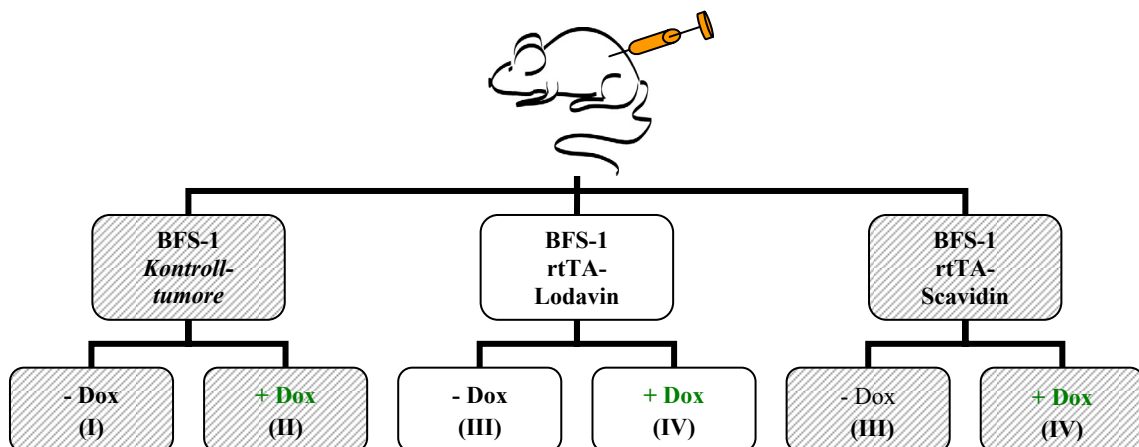


Abb. III.1.16 Fließschema des Versuchablaufs

(-Dox) Trinkwasser, (+Dox) 100 µg/ml Doxzyklin. (I), (II), (III), (IV) vereinfachte Bezeichnung der Gruppen innerhalb des Versuchs.

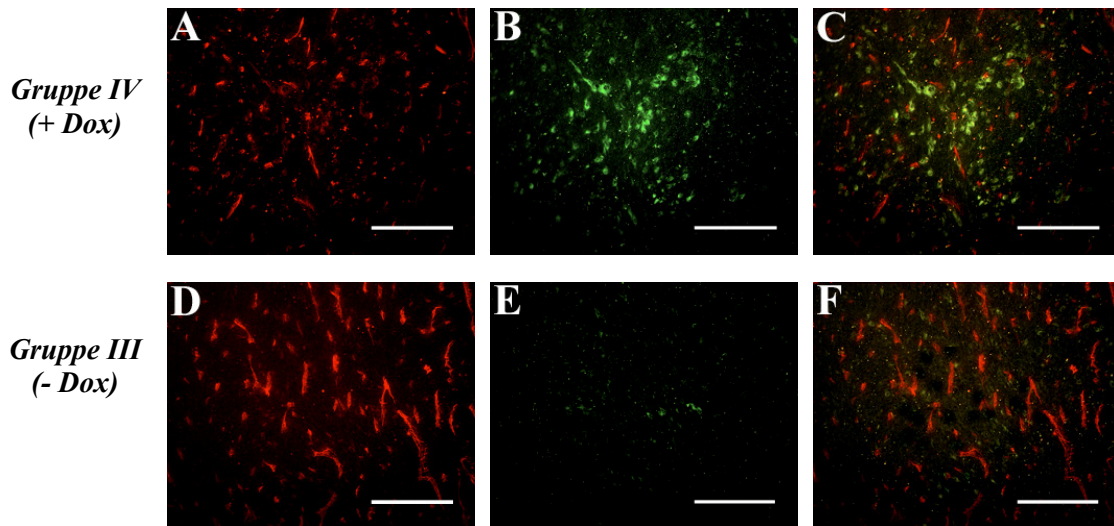


Abb. III.1.17 Tumorzellspezifische Expression von Scavidin *in vivo*

1,5x10⁶ BFS-1/Scavidin Fibrosarkoma Zellen des Klons #39 wurden adulten Wildtyp Mäusen subkutan injiziert. Zur regulierten Expression des Fusionsproteins erhielten die Tiere 100 µg/ml Doxyzyklin (A-C; Gruppe IV) bzw. normales Trinkwasser (D-F; Gruppe III). 14 Tage p.i. wurden die Tumoren entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen gegen PECAM-1 und die Avidindomäne von Scavidin wurden angefertigt. Die Tumoren waren gut vaskularisiert, wie anhand der PECAM-1 Färbungen gezeigt (A/D). Scavidin Reaktivität wurde in Tumorzellen gefunden und trat ausschließlich in Gegenwart des Induktors Doxyzyklin auf (B). Die Überlagerung der Färbungen bestätigte die Expression von Scavidin in Tumorzellen, während Gefäße keine Reaktivität aufwiesen (C). Es wurde keine unspezifische Hintergrundexpression ohne Gabe von Doxyzyklin beobachtet (D/E).

Balken: 100 µm

Fibrosarkome der Gruppen III und IV waren unabhängig von der Gabe des Induktors gleichmäßig vaskularisiert, wie die Färbung von PECAM-1 zeigte (Abb. III.1.17 A/D). Tumoren der Gruppe IV zeigten eine Expression von Scavidin, die nicht gefäßassoziiert auftrat (Abb. III.1.17 B/C). In Abwesenheit des Induktors (Gruppe III) wurde keine Hintergrundexpression beobachtet (Abb. III.1.17 E). Morphologische Unterschiede im Tumorgewebe der Gruppen I-IV wurden nicht festgestellt. So war die Ausbildung von Nekrosen, Tumorgefäßen sowie deren Dichte und Struktur vergleichbar.

Die statistische Auswertung der Tumorgewichte zeigte, dass die regulierte tumorzellspezifische Expression von Scavidin zu einem signifikanten Anstieg des Tumorgewichts führte (Abb. III.1.18). So lag das mittlere Gewicht der Fibrosarkome aus Gruppe IV signifikant über dem der Gruppe III ($p < 0,05$). Zudem wurde beobachtet, dass Tumoren aus Transfektanten (Gruppe III, IV) unabhängig von der Expression des Fusionsproteins eine Wachstumssteigerung gegenüber Kontrolltumoren (Gruppe I, II)

Gruppe	I	II	III	IV
Zellen	BFS-1	BFS-1	BFS-1/ Scavidin	BFS-1/ Scavidin
Dox	-	+	-	+
n	12	10	10	13
x [mg]	238,98	322,54	340,23	447,8
SD	74,94	55,95	98,9	89,79
SE	21,88	17,69	29,82	24,90

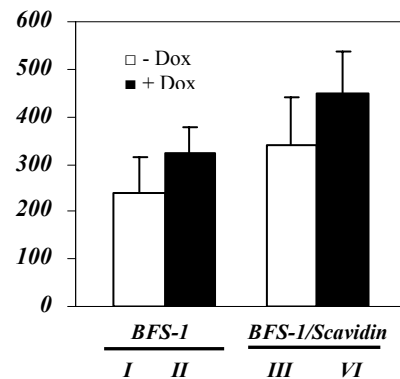


Abb. III.1.18 Übersicht der Tumorgewichte [mg] an Tag 14 p.i.

1,5x10⁶ BFS-1 bzw. BFS-1/Scavidin Zellen wurden adulten Wildtyp Tieren subkutan injiziert. Zur regulierten Expression des Fusionsproteins erhielten die Tiere 100 µg/ml Doxyzyklin (Gruppe II und IV) bzw. normales Trinkwasser (Gruppe I und III). 14 Tage post Injektion wurden die Tumoren entnommen und das Gewicht [mg] bestimmt. Die Expression von Scavidin führte zu einer signifikanten Zunahme des Tumorgewichts (Gruppe III und IV, $p < 0,05$). Transfektanten (BFS-1/Scavidin) waren im Vergleich zu Kontrolltumoren (BFS-1) signifikant wachstumsgesteigert. Zudem beeinflusste Doxyzyklin signifikant das Wachstum von Kontrolltumoren (Gruppe I und II, $p < 0,005$). (Dox) Doxyzyklin, (n) Anzahl der Tumoren je Gruppe, (SD) Standardabweichung, (SE) Standardfehler, (x) Mittelwert der Gewichte

aufwiesen, die mit einer signifikanten Zunahme des Gewichts einher ging (I:III $p < 0,01$; II:IV $p < 0,05$). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass allein die Verabreichung von Doxyzyklin Einfluss auf das Tumorwachstum nahm. So wiesen Kontrolltumoren der Gruppe II im Vergleich zu denen aus Gruppe I eine signifikante Zunahme des mittleren Gewichtes auf ($p < 0,005$).

Um den Einfluss von Doxyzyklin auf das Wachstumsverhalten von Zellen zu analysieren, wurde ein Proliferationstests *in vitro* durchgeführt (Abb. III.1.19). Hierzu wurde eine definierte Anzahl Wildtyp Zellen (Gruppe I und II) sowie Zellen des BFS-1/Scavidin Klons #39 (Gruppe III und IV) ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte für 3 Tage unter Zugabe (Gruppe II und IV) und ohne Zugabe von Dox (Gruppe I und III). Die Zellzahl wurde anschließend bestimmt und statistisch ausgewertet. Transfektanten wiesen unabhängig von der Expression des Fusionsproteins und damit unabhängig von Dox dasselbe Wachstum auf (Gruppe III und IV). Gleiches konnte bei der Kultivierung von Wildtyp Zellen beobachtet werden (Gruppe I und II). *In vitro* konnte somit kein Einfluss von Dox auf das Proliferationsverhalten der Zellen bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich ein inhibiertes Wachstum der Transfektanten im Vergleich zu Wildtyp BFS-1 Zellen

Gruppe	I	II	III	IV
Zellen	BFS-1	BFS-1	BFS-1/ Scavidin	BFS-1/ Scavidin
Dox	-	+	-	+
n	6	6	6	6
x	123250	120170	772330	79300
SD	8388,98	136000	9886,06	4244,53
SE	3423,8	5552,2	4035,9	1732,8

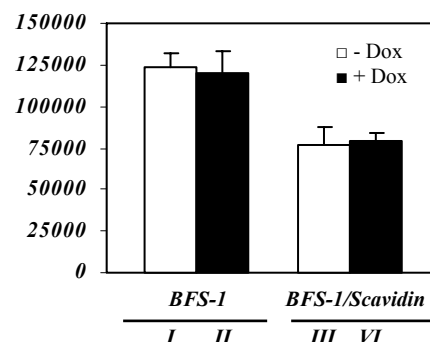


Abb. III.1.19 *In vitro* Proliferationstest

10^4 BFS-1 bzw. BFS-1/Scavidin Zellen des Klons #39 wurden ausplattiert. Zur regulierten Expression des Fusionsproteins wurden die Zellen in Gegenwart von 2 µg/ml Doxyzyklin (Gruppe II und IV) bzw. ohne die Zugabe von Doxyzyklin (Gruppe I und III) kultiviert. Nach 3 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Die Expression von Scavidin beeinflusste das Zellwachstum nicht (Gruppe III und IV). Transfektanten (Gruppe III und IV) waren im Vergleich zu Kontrollzellen (Gruppe I und II) signifikant proliferationsgehemmt ($p < 0,0001$). Die Zugabe von Dox hatte keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von BFS-1 und BFS-1/Scavidin Zellen. (Dox) Doxyzyklin, (n) Anzahl der Werte je Gruppe, (SD) Standardabweichung, (SE) Standardfehler, (x) Mittelwert der Zellzahl innerhalb einer Gruppe

($p < 0,0001$). Zusätzlich wurde der Einfluss von Biotin auf den Proliferationsindex analysiert. Die Zugabe von 4 ng/ml Biotin, welches der physiologischen Konzentration im Serum entspricht, führte zu keiner Veränderungen im Wachstumsverhalten kultivierter Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese *in vitro* Daten sprechen dafür, dass das gesteigerte Wachstum der Scavidin-exprimierenden Tumoren im Tiermodell auf das Mikroumfeld des Tumors zurückzuführen sein könnte.

III.1.3 *In vivo* Bindungsstudien systemisch applizierter biotinylierter Liganden

Im Folgenden sollten die Fusionsproteine auf ihre Bindungsfähigkeit zur spezifischen Akkumulierung biotinylierter Liganden zu therapeutischen und/oder diagnostischen Zwecken untersucht werden. Hierzu war zu Beginn dieser Arbeit geplant, dass Ark Therapeutics, London, sowie die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seppo Ylä-Herttuala am I.A. Virtanen Institut der Universität Kuopio, Finnland, biotinylierte Chemotherapeutika bzw. Radionuklide generieren, um sie an den drei in der vorliegenden Arbeit etablierten *in vivo* Modellen zu testen. Da es den Kooperationspartnern bislang nicht möglich ist, ein funktionales biotinyliertes Agens herzustellen, wurden die ersten Studien mit biotinylierten Modellliganden durchgeführt. Basierend auf den Bindungseigenschaften von Lodavin und der starken Expression dieses Fusionsproteins in ca. 70% aller Gefäße

der Milz adulter Flk-1-Lodavin transgener Mäuse, wurden die Versuche an Tieren dieser Linie und ohne Transplantation eines Tumors durchgeführt. Zudem demonstrierten die Aufnahmen konfokaler Mikroskopie, dass Lodavin auf der Oberfläche der Endothelzelle lokalisiert war und gleichermaßen zur luminalen wie abluminalen Seite innerhalb des Gefäßes exprimiert wurde (Abb. III.1.6 D-E). Die Versuche wurden an adulten transgenen Tieren der F₂-F₄ Generation durchgeführt (Abb. III.1.20). Als Negativkontrolle dienten Wildtyp Tiere des gleichen Alters und Geschlechts. Der biotinylierte Ligand wurde systemisch durch intravenöse Injektion in eine der Schwanzvenen appliziert und dessen Verteilung im Körper durch Untersuchungen der Milz, Leber, Niere und Lunge analysiert. Einen Überblick der verabreichten Liganden, das Zeitintervall der Perfusion nach dessen intravenöser Applikation und die sich anschließende Methode zur Darstellung des Liganden im Gewebe gibt Tabelle II.6.

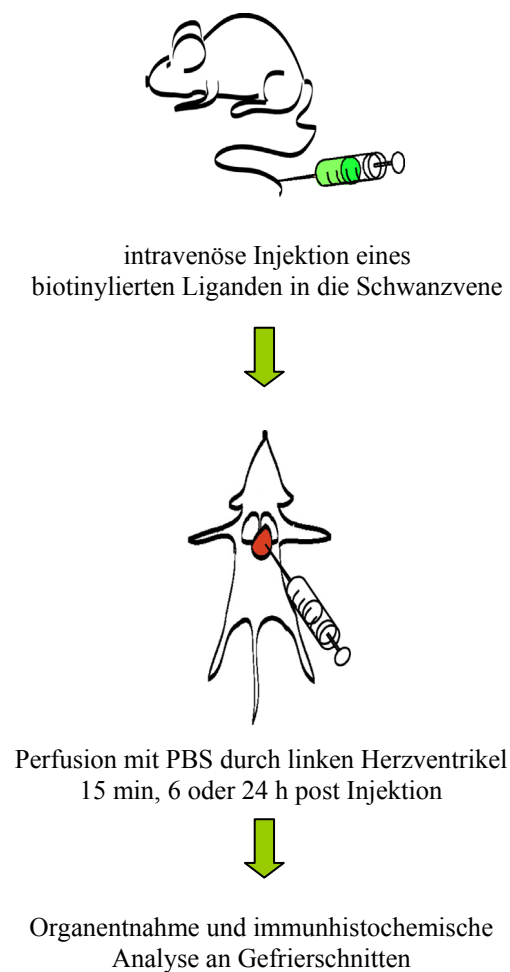
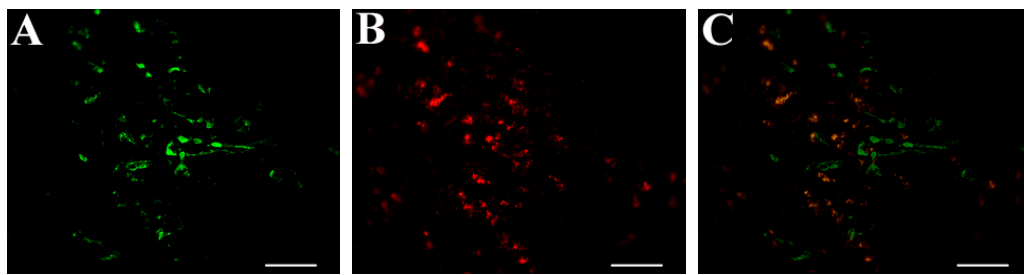


Abb. III.1.20 Fließschema des Versuchablaufs

Die Lokalisierung des applizierten biotinylierten Fluorescein durch direkte Untersuchung der Organschnitte im Fluoreszenzmikroskop erbrachte keine auswertbaren Ergebnisse. Der Ligand wurde in keinem der analysierten Organe wieder gefunden. Darüber hinaus wiesen die untersuchten Gewebe eine geringe Autofluoreszenz auf, was die Analyse zusätzlich erschwerte. Auch biotinylierte HRP wurde in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen. Weder der indirekte Nachweis durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen HRP, noch eine durch das Enzym HRP hervorgerufene Farbreaktion führten zur Detektion des Liganden. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Schnitte nach systemischer Verabreichung biotinylierter Fluorospheres wurden diese im Gefäßsystem detektiert. Fluorospheres von 4 µm Durchmesser akkumulierten trotz Perfusion speziell im Gefäßsystem der Milz, wurden aber auch in der Milz von Kontrolltieren gefunden. Quantitative Unterschiede waren nicht ersichtlich, so dass diese Befunde nicht mit der Expression von Lodavin in Zusammenhang standen. Eine mögliche Erklärung könnte die physiologische Funktion der Milz bei der Blutmauserung sein. Die Größe der verwendeten Fluorospheres entspricht in etwa der rigider Erythrozyten, was zur Ansammlung des Liganden im Gefäßsystem der Milz führen könnte. Analysen der Gewebeschnitte nach Applikation der beiden kleineren Fluorospheres mit einer Größe von 1 bzw. 0,04 µm zeigten, dass diese von metabolisierenden Organen wie Milz und Leber abgefangen wurden. In Niere und Lunge wurden die Liganden nur vereinzelt beobachtet. Die verwendeten Fluorospheres scheinen durch ihre Oberflächenstruktur und Ladung nicht inert zu sein und werden möglicherweise unspezifisch vom retikuloendothelialen System dieser Organe gebunden und phagozytiert. Somit wurden auch in diesem Versuchsansatz keine quantifizierbaren Unterschiede in der Verteilung der Liganden zwischen Transgenen- und Kontrolltieren gefunden.

Nach Applikation des biotinylierten Kaninchen-Immunglobulins (b-rbIgG) wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen an Gewebeschnitten durchgeführt (Abb. III.1.21). Hierzu wurde ein Antikörper gegen die Avidindomäne von Lodavin sowie ein monoklonaler anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Färbungen demonstrierten die Expression von Lodavin in Gefäßen der roten Pulpa (Abb. III.1.21 A) sowie die Lokalisation des applizierten Liganden in der Milz (Abb. III.1.21 B). Die Überlagerung der beiden Färbungen bestätigte, dass b-rbIgG ausschließlich in Co-Lokalisation mit dem Fusionsprotein Lodavin zu finden war (Abb. III.1.21 C). Unspezifische Bindungen im Gefäßsystem anderer Organe oder der Milz von Wildtyp Tieren wurden nur vereinzelt beobachtet (Daten nicht gezeigt).

**Abb. III.1.21 Spezifische Bindung eines biotinylierten Liganden *in vivo***

Adulten Flk-1-Lodavin transgenen Mäusen wurde biotinylierter Kaninchen Antikörper (rb-IgG) intravenös injiziert. 15 min p.i. wurden die Mäuse mit PBS- perfundiert, die Milz entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen wurden gegen Lodavin und den biotinylierten rb-IgG durchgeführt. **A.** Gefäße der Milz zeigten eine Reaktivität gegen Lodavin. **B.** Der biotinylierte rb-IgG wurde gefäßassoziiert detektiert. **C.** Die Überlagerung der Färbung zeigte, dass der Ligand ausschließlich in Co-Lokalisation mit Lodavin in Endothelien der Milzgefäße zu finden war. Eine unspezifische Bindung wurde nur vereinzelt beobachtet.

Balken: 50µm

Wurde die Perfusion 6 oder 24 Stunden nach i.v. Injektion des Liganden durchgeführt, so konnte der applizierte b-rbIgG nicht detektiert werden. Die Bindungsstudien bestätigten die Funktionalität des Lodavin-Systems *in vivo*. Die systemische Verabreichung eines biotinylierten Modellliganden, hier des biotinylierten Kaninchen-Antikörpers, führte zu einer spezifischen Bindung an das Fusionsprotein und damit zu einer Akkumulation im Lodavin-exprimierenden Gewebe. Dennoch wird deutlich, dass trotz der hohen Bindungsaffinität von Biotin zu Avidin das System stark von der Struktur, Größe und chemischen Zusammensetzung des verabreichten Liganden abhängig ist. In Zusammenarbeit mit Ark Therapeutics, London und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Ylä-Herttuala, Kuopio, Finnland, sollte die Generierung und das systematische Austesten geeigneter Liganden sowie therapeutischer und/oder diagnostischer Konjugate Aufgabe weiterer Arbeiten sein.

III.2 Einfluss dominant-negativer Transkriptionsfaktoren auf die Tumorangiogenese

III.2.1 Dominant-negatives Ets-1

Ets-1 gehört zur großen Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und ist maßgeblich an der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl angiogeneserelevanter Gene beteiligt. *In vivo* ist die Expression von Ets-1 assoziiert mit der Aktivierung von Endothelzellen. Sie tritt in adulten, ruhenden Endothelzellen nicht auf, wird aber während der Vaskularisierung von Tumoren in Endothelzellen und vaskulären Muskelzellen sowie in Fibrozyten des Tumorstromas transient reaktiviert (Bolon et al., 1995; 1996; Wernert et al., 1992; 2002). Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass die Überexpression von Ets-1 in Endothelzellen zu einem angiogenen, invasiven Phänotyp führte, der eine erhöhte Expression diverser Matrix-Metalloproteinasen aufwies (Oda et al., 1999). Die Hemmung Ets-1-abhängiger Signalwege durch antisense Oligodesoxyribonukleotide oder durch Überexpression verschiedener Ets-1-Deletionsmutanten führte hingegen in unterschiedlichen Modellen zur Inhibierung der *in vitro* und physiologischen *in vivo* Angiogenese (Delannoy-Courdent et al., 1998; Mattot et al., 2000; Nakano et al., 2000; Pourtier-Manzanedo et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollten Ets-1 Signalwege während des Tumorwachstums durch retrovirale Überexpression einer Deletionsmutante blockiert werden. Die Auswirkung auf die pathophysiologische Vaskularisierung und die Tumorprogression sollte untersucht und als mögliches anti-angiogenes Modell für die Tumorthherapie analysiert werden.

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde eine Deletionsmutante des Transkriptionsfaktors Ets-1 hergestellt (Delannoy-Courdent et al., 1998; Abb. III.2.1 A). Dabei wurden die Transaktivierungsdomäne (TAD), die α -helikale Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen (PNT) und die größten Anteile des Autoinhibitionsmoduls (ID) deletiert. Die resultierende cDNA (311 bp) wurde als dominant-negatives Ets-1 (dnEts-1) bezeichnet und codierte für die Aminosäuren 306-423. Somit verfügt dnEts-1 über die gesamte DNA-Bindungsdomäne (ETS) und eine Kernlokalisationssequenz. Wird die Mutante im Überschuss exprimiert, so konkurriert diese mit endogenen Ets-Faktoren um die Bindung an die Konsensussequenz (EBS). Durch Deletion des größten Anteils des Autoinhibitionsmoduls ist sie zur Bindung an die DNA begünstigt, bewirkt jedoch eine Blockierung des Promotors ohne Transaktivierung desselben. Um in späteren Analysen dnEts-1 vom endogenen Transkriptionsfaktor Ets-1

unterscheiden zu können, wurde die Mutante mit einer spezifischen Erkennungssequenz versehen. Diese Sequenz codiert für das 8 Aminosäuren lange Signalepitop „FLAG“, gegen das spezifische monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind. Die codierende Sequenz für dnEts-1 wurde mittels der Oligonukleotide mEts-1 FW1 und dnEt-1+Flag REV aus dem Plasmid pMFG-DBC (Mattot et al., 2000) amplifiziert. Dabei binden die ersten 22 Basenpaare des 3'-Oligonukleotides innerhalb der Ets-1 codierenden Sequenz während die übrigen 37 Basen für das carboxyterminale Signalepitop codieren und dabei ein überhängendes Ende bilden. Das 5'-Oligonukleotid verfügt über eine *XhoI*-Schnittstelle. Das amplifizierte und aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *XhoI* geschnitten und in die *XhoI/EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pKSII(+) subkloniert. Nach sequenzanalytischer Kontrolle des pKS-dnEts-1 wurde aus diesem die cDNA für dnEts-1-FLAG mittels der Restriktionsendonukleasen *XhoI/BamHI* isoliert und zur Generierung des retroviralen Konstruktes in die entsprechenden Schnittstellen des pLXSN-Vektors kloniert. Die Aktivität des Konstruktes pLXSN-dnEts-1 wurde durch transiente Transfektion der Affen-Nieren-Epithelzelllinie COS-1 bestätigt. Hierzu wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das Signalepitop immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Deutlich ist die nukleäre Lokalisation der Deletionsmutante zu erkennen (Abb. III.2.1 B).

Um zunächst *in vitro* den Einfluss der Deletionsmutante auf die Aktivität eines Ets-1 induzierbaren Promotors zu analysieren, wurden Luziferase-Reportergen-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde dnEts-1 unter der Kontrolle der retroviralen 5'LTR in der immortalisierten humanen Endothelzelllinie HUE und in der humanen embryonalen Nierenzelllinie A293 überexprimiert. Das Reporter-Plasmid pFlk-1-Luc (Kappel et al., 1999), bei dem die Expression des Reportergens Luziferase (Luc) vom murinen *flk-1* Promotor reguliert wird, wurde co-transfiziert. Dieser Promotor enthält sechs putative Bindungsstellen für Ets-1 (EBS1-EBS6), von denen zwei (EBS3 und EBS6) funktional und maßgebliche an der Regulation des *flk-1* Promotors *in vitro* beteiligt sind (Kappel et al., 1999). Die Zellen wurden 24-48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Luziferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die basale Aktivität des verwendeten Flk-1-Promotors wurde gleich 1 gesetzt, so dass alle weiteren Werte relativ zu diesem Basalwert dargestellt wurden. In den transfizierten HUE Zellen wurde die basale Aktivität des Reportergens durch Expression von pLXSN-dnEts-1 um 37% reduziert (Abb. III.2.1 C).

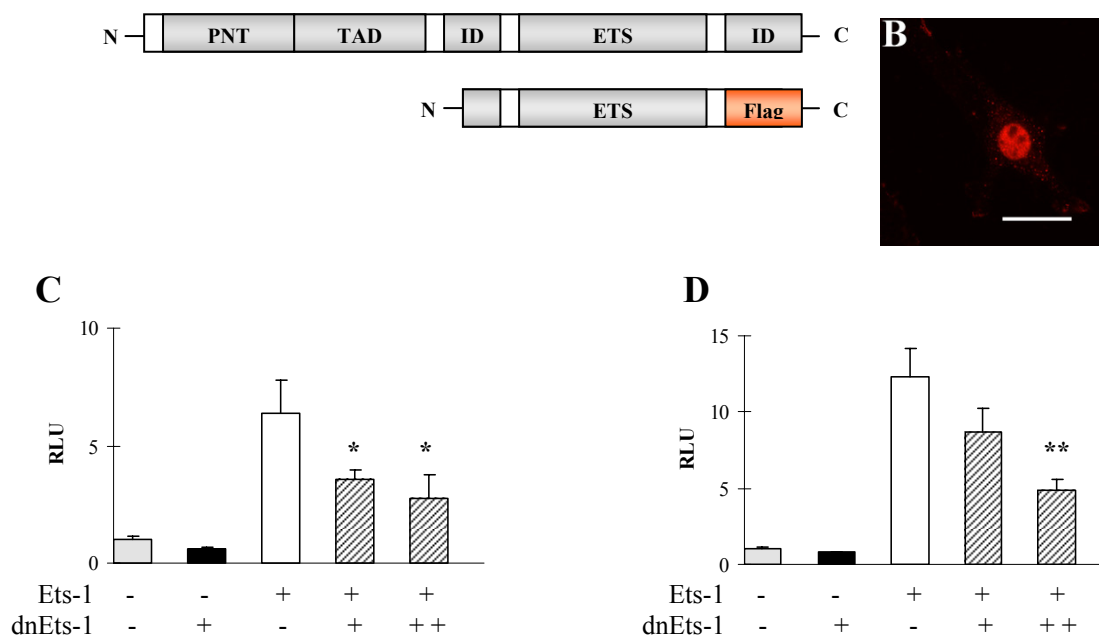


Abb. III.2.1 Struktur und Funktion der Deletionsmutante dnEts-1 *in vitro*

A. Domänenstruktur von Ets-1 und dnEts-1. Das Helix-Schleife-Helix Motiv (PNT), die Transaktivierungsdomäne (TAD) und Teile des Autoinhibitionsmoduls (ID) wurden in dnEts-1 deletiert, während die Domäne zur Bindung an die DNA (ETS) erhalten blieb. **B.** Lokalisation von dnEts-1 in COS-1 Zellen. Die Zellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt transient transfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das FLAG Epitop durchgeführt. DnEts-1 war ausschließlich im Zellkern lokalisiert. **C./D.** Luziferase-Reporter-Experimente. *Flk-1* Promotor-Luziferase wurde in HUE (C) und A293 Zellen (D) transfiziert. Durch Expression von Ets-1 wurde der *flk-1* Promotor stimuliert, durch Co-Expression von dnEts-1 wurde die Stimulierung inhibiert.

Balken: 20 μ m, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Transfektion von pCMV-Ets-1 stimulierte die Aktivität des Promotors um das 6-fache. Durch Co-Transfektion gleicher Mengen von pLXSN-dnEts-1 und pCMV-Ets-1 wurde die Ets-1 abhängige Stimulation signifikant reduziert, nämlich um 44 % ($p < 0,05$). Eine vollständige Reduzierung auf basales Level konnte selbst durch einen Überschuss von pLXSN-dnEts-1 nicht erreicht werden. Die Ets-1 induzierte Stimulierung wurde maximal um 57% reduziert. Auch in der zweiten verwendeten Zelllinie wurde der inhibitorische Einfluss der Transkriptionsfaktormutante gezeigt (Abb. III.2.1 D). Wurde dnEts-1 in A293 Zellen überexprimiert, so konnte die Basalaktivität des Reportergens um 16 % reduziert werden. Die Überexpression des Wildtyp Transkriptionsfaktors Ets-1 resultierte in einer 12-fachen Steigerung der Promotoraktivität. Wurden Ets-1 und die Mutante dnEts-1 in die Zelllinie co-transfiziert, so führte dies zu einer signifikanten

Reduzierung der Promotoraktivität in Abhängigkeit der Plasmidkonzentrationen. Die Ets-1 induzierte Stimulierung des Flk-1 Promotors wurde um 30 % bei gleichen Mengen der Plasmide bzw. um 60 % bei einem Überschuss der Mutante reduziert ($p < 0,01$). In keiner der verwendeten Zelllinien konnte eine vollständige Reduzierung auf basales Level erreicht werden. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedlichen Expressionsstärken von Ets-1 und dnEts-1 aufgrund der verschiedenen Promotoren sein. Dennoch ließen die *in vitro* Experimente den Schluss zu, dass die generierte dnEts-1 Mutante die Aktivierung des Ets-1 Zielgens *flk-1* signifikant inhibieren kann.

Zur Generierung der dnEts-1 codierenden Retroviren wurde das Konstrukt pLXSN-dnEts-1 in die Verpackungszelllinie GP+E86 eingebracht. Durch Kultivierung und Vermehrung der transfizierten Zellen in Neomycin-haltigem Selektionsmedium (1 mg/ml) wurden schließlich 15 Klone isoliert, die mit GP+E86/dnEts-1 #1-15 benannt wurden. Alle Klone wurden hinsichtlich der Expression der Deletionsmutante proteinbiochemisch untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das FLAG-Epitop (Abb. III.2.2 A).

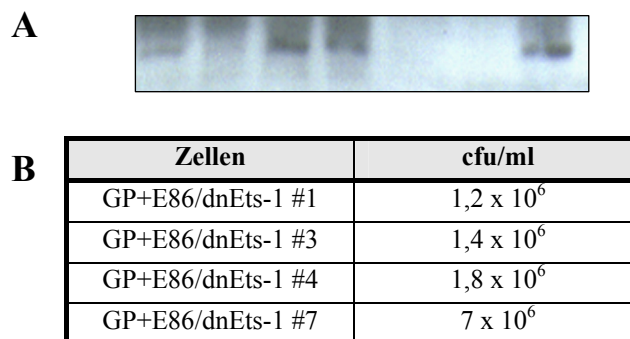


Abb. III.2.2 Analyse virusproduzierender GP+E86/dnEts-1 Zellen

GP+E86 Zellen wurden mit dem pLXSN-dnEts-1 Konstrukt transfiziert und zur Selektion auf stabile Vektorintegration in Neomycin-haltigem Medium kultiviert. **A.** Nachweis der dnEts-1 Expression durch Western Blot Analyse. Proteinlysate wurden aus den selektierten Klonen (1-7) hergestellt. Diese wurden mittels 15%iger SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulose Membran immobilisiert. Zur Detektion des FLAG Epitops wurde der anti-FLAG M2 Antikörper verwendet. Die Klone mit den Nummern 1, 3, 4 und 7 zeigten ein spezifisches Signal mit einer molekularen Masse von ca. 14 kDa. **B.** Bestimmung des Virustiters in Medienüberständen verschiedener GP+E86/dnEts-1 Klone durch Infektion von NIH 3T3 Zellen. (cfu) „colony forming units“ = koloniebildene Einheiten

Dabei wiesen die Klone mit der Nummer 1, 3, 4 und 7 ein spezifisches Signal für dnEts-1 mit einer molekularen Masse von ~14 kDa auf. Die Klone mit der Nummer 2, 5 und 6 exprimierten die Deletionsmutante nicht. Da die selektionierten GP+E86/dnEts-1 Klone im Folgenden für *in vivo* Versuche verwendet werden sollten, wurde der Virustiter bestimmt (Abb. III.2.2 B). Mit einer Anzahl von 7×10^6 cfu/ml wurde für den GP+E86/dnEts-1 Klon mit der Nummer 7 die höchste Anzahl infektiöser Partikel pro Milliliter Zellkulturüberstand bestimmt, so dass dieser für den retroviralen Gentransfer der Deletionsmutante *in vivo* verwendet wurde.

Vorangegangene Arbeiten demonstrierten, dass es sich bei BFS-1 Fibrosarkomen um stark vaskularisierte Tumoren handelt, deren Wachstum von der Rekrutierung benachbarter Gefäße abhängt (Heidenreich et al., 2004). Dieser Prozess wird durch das VEGF/VEGFR-Signaltransduktionssystem reguliert. So konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von VEGFR-Mutanten, die zur Bindung des Liganden VEGF, nicht aber zur Signaltransduktion fähig waren, eine signifikante Inhibition des Tumorstwachstums durch Hemmung der Tumorangio-genese erzielt wurde. Dies schien auf einer selektiven Infektion einsprossender Endothelzellen des Gefäßsystems zu beruhen, da sich BFS-1 Zellen als nicht infizierbar erwiesen (Abb. III.2.3).

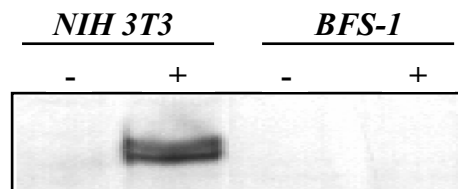


Abb. III.2.3 Infektion von BFS-1 Fibrosarkoma Zellen *in vitro*

Western Blot Analyse von Zelllysaten. BFS-1 Fibrosarkoma Zellen und 3T3 NIH Zellen zur Kontrolle wurden mit viralen Überständen der GP+E86/Flt-TM (+) oder GP+E86/empty Zellen (-) inkubiert. Zwei Tage nach Infektion wurden aus den Zellen Proteinlysate hergestellt, mittels 7,5%iger SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulose Membran immobilisiert. Zur Detektion der Rezeptormutante Flt-TM wurde ein monoklonaler anti-VEGFR-1 Antikörper verwendet. Infizierte NIH 3T3 (+), nicht aber BFS-1 Zellen, zeigten eine Expression der Rezeptormutante mit einer molekularen Masse von ca. 180 kDa.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der dominant-negative Effekt der Deletionsmutante auf die Promotoraktivität des *flk-1* Gens und anderer an der Tumorangiogenese beteiligter Gene zu einer Hemmung der Expression *in vivo* führt und damit die Neovaskularisierung negativ beeinflusst. Hierzu wurde das Modell der Co-Injektion von Tumorzellen mit virusproduzierenden GP+E86 Zellen verwendet (Abb. III.1.12). BFS-1 Zellen wurden zu gleichen Teilen mit den retrovirusproduzierenden GP+E86/dnEts-1 Zellen des Klons #7 gemischt und adulten Wildtyp Tieren subkutan transplantiert. Als Negativkontrolle wurden BFS-1 und GP+E86 Zellen co-injiziert, die stabil den pLXSN-Leervektor integriert hatten (GP+E86/empty) und über einen vergleichbaren Virustiter verfügten. Sieben bzw. 14 Tage nach Inokulation wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet, die Tumoren entnommen, gewogen und untersucht. Die semiquantitative RT-PCR Analyse von Tumorlysaten an Tag 7 nach Transplantation wurde mittels spezifischer Oligonukleotide für dnEts-1 bzw. Wildtyp Ets-1 durchgeführt und bestätigte deren Expression in BFS-1/dnEts-1 Tumoren (Abb. III.2.4 A). Kontrolltumoren exprimierten ausschließlich endogenes Ets-1. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Deletionsmutante in den BFS-1/dnEts-1 Fibrosarkomen verglichen mit Kontrolltumoren zu einer leichten Abnahme der Flk-1 Expression im Tumorgewebe führte. Gleiche Mengen an cDNA wurden durch die Amplifikation des Haushaltgens GAPDH bestätigt. Histologisch konnte die endothelzellspezifische Expression der dnEts-1 Mutante durch Verwendung des spezifischen Antikörpers gegen das Signalepitop nicht demonstriert werden. Dieser Antikörper (α -Flag M2; Sigma, Deishofen) ist in der Maus generiert und vermochte keine spezifische Färbung auf Schnitten des murinen Tumorgewebes hervorzurufen. An dieser Stelle sei auf die Endothelzellspezifität des Co-Injektionsmodells von BFS-1 Fibrosarkoma mit GP+E86 Zellen zu verweisen, die im vorherigen Kapitel demonstriert wurde (Abb. III.1.13). Als indirekter Beweis der endothelzellspezifischen Expression von dnEts-1 wurden BFS-1 und NIH 3T3 Zellen mit virushaltigen Überständen des GP+E86/dnEts-1 Klons #7 bzw. von GP+E86/empty Zellen kultiviert. Während infizierte NIH 3T3 Zellen dnEts-1 exprimierten und damit die Aktivität des Retrovirus bestätigten, zeigten BFS-1 Zellen keine Expression (Abb. III.2.4 B).

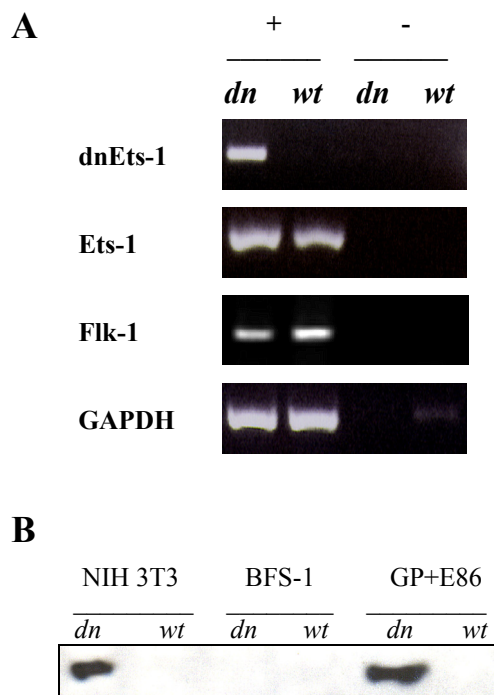


Abb. III.2.4 Analyse von BFS-1 Fibrosarkomen

A. RT-PCR Analyse von Tumorsysaten. $1,5 \times 10^6$ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden mit gleicher Anzahl retrovirusproduzierender GP+E86/dnEts-1 (*dn*) bzw. GP+E86/empty (*wt*) Zellen adulten Wildtyp Mäusen subkutan co-injiziert. 7 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und RNA isoliert. Durch semiquantitative Reverse-Transkriptase (RT)-PCR wurde die Expression der Deletionsmutante dnEts-1, des endogenen Wildtyp Transkriptionsfaktors Ets-1 sowie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Flk-1 analysiert (+). Es wurden Kontrollreaktionen ohne RT mitgeführt (-). Gleiche Mengen cDNA wurden durch 25 Zyklen für GAPDH bestätigt. In geringem Maße war Flk-1 durch Überexpression von dnEts-1 reduziert. **B.** Western Blot Analyse von Zelllysaten. NIH 3T3 und BFS-1 Zellen wurden mit viralen Überständen der GP+E86/dnEts-1 (*dn*) oder GP+E86/empty Zellen (*wt*) inkubiert. Zwei Tage nach Infektion wurden aus den Zellen Proteinlysate hergestellt, mittels 15%iger SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulose Membran immobilisiert. Zur Detektion des FLAG Epitops wurde der Anti-FLAG M2 Antikörper verwendet. Infizierte NIH 3T3 (*dn*) sowie GP+E86/dnEts-1 (*dn*) zeigten ein spezifisches Signal mit einer molekularen Masse von ca. 14 kDa.

Die Auswertung des Tumorwachstums durch Bestimmung der Masse zeigte, dass die Überexpression der Deletionsmutante dnEts-1 keinen Einfluss auf das Wachstum der Fibrosarkome hatte. So zeigte sich weder nach 7 noch nach 14 Tagen ein signifikanter Unterschied im mittleren Gewicht der Tumoren beider Gruppen (Abb. III.2.5 A/B). Fibrosarkome, die dnEts-1 exprimierten, wiesen ein mittleres Gewicht von 66 (± 23) mg bzw. 262 ($\pm 141,66$) mg auf, solche der Kontrollgruppe eines von 55 (± 25) mg bzw.

248,25 ($\pm 211,58$) mg. Auch ein vierfacher Überschuss an virusproduzierenden GP+E86/dnEts-1 Zellen bei der Co-Injektion mit BFS-1 Fibrosarkomen beeinflusste das Tumorstwachstum nicht (Daten nicht gezeigt). Um evtl. auftretende Veränderung der Tumorstvaskularisierung durch Überexpression von dnEts-1 beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen mittels spezifischer Antikörper gegen die Endothelzellmarker Flk-1 und PECAM-1 durchgeführt. Trotz leichter Abnahme der Flk-1 Expression auf mRNA Ebene (Abb. III.2.4 A) zeigten die histologischen Untersuchung der Tumoren beider Gruppen keine wesentlichen Unterschiede in der Vaskularisierung. Die Gefäß- und Gewebemorphologie sowie die Ausbildung und Häufigkeit von auftretenden Nekrosen von BFS-1/dnEts-1 war mit denen von Kontrolltumoren vergleichbar (Abb. III.2.5 C).

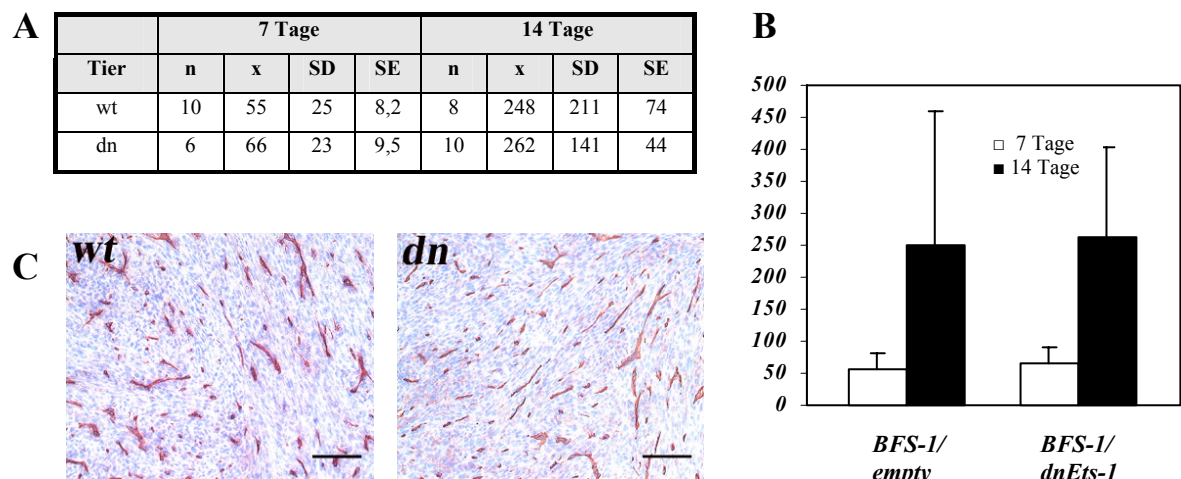


Abb. III.2.5 Wachstum subkutaner BFS-1 Fibrosarkome 7 und 14 Tage p.i.

$1,5 \times 10^6$ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen wurden mit der gleichen Anzahl virusproduzierenden GP+E86/empty (wt) oder GP+E86/dnEts-1 (dn) Zellen adulten Wildtyp Tieren subkutan co-injiziert. A./B. Sieben bzw. 14 Tage post Injektion wurden die Tumoren entnommen, das Gewicht [mg] bestimmt und statistisch ausgewertet. C. Immunhistochemische Färbungen wurden gegen PECAM-1 angefertigt. In der Vaskularisierung der Tumoren beider Gruppen waren keine Unterschiede zu erkennen. (n) Anzahl der Tumoren je Gruppe, (SD) Standardabweichung, (SE) Standardfehler, (x) Mittelwert der Gewichte in mg
Balken: 100µm

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben eines inhibitorischen Effekts der Deletionsmutante vom verwendeten Tumortyp abhängig ist, sollte dnEts-1 in einem zweiten experimentellen Tumormodell überexprimiert werden. Hierzu wurden Melanoma Zellen mit den virusproduzierenden GP+E86/dnEts-1 Zellen bzw. B16 GP+E86/empty Kontrollzellen co-injiziert. Vierzehn Tage nach Inokulation wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet, die Tumoren entnommen, gewogen und analysiert. Die Expression der Deletionsmutante dnEts-1 und des Wildtyp Transkriptionsfaktors Ets-1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR von Tumorlysaten bestätigt (Abb. III.2.6). Kontrolltumoren exprimierten ausschließlich endogenes Ets-1. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Deletionsmutante in den B16/dnEts-1 Melanomen verglichen mit Kontrolltumoren zu einer starken Reduktion der Flk-1 Expression im Tumorgewebe führte. Gleiche Mengen an cDNA wurden durch das Amplifikat des Haushaltgens GAPDH bestätigt.

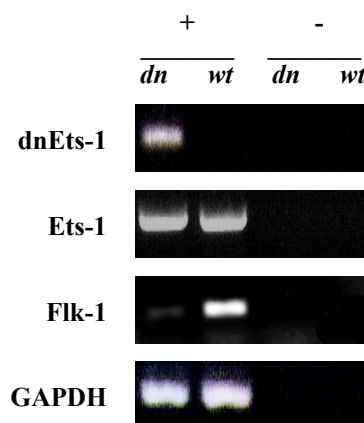


Abb. III.2.6 RT-PCR Analyse von B16 Melanomen

1,5x10⁶ B16 Melanoma Zellen wurden mit der gleichen Anzahl retrovirusproduzierender GP+E86/dnEts-1 (*dn*) bzw. GP+E86/empty (*wt*) Zellen adulten Wildtyp Mäusen subkutan co-injiziert. 14 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und RNA isoliert. Durch semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR wurde die Expression der Deletionsmutante dnEts-1, des endogenen Wildtyp Transkriptionsfaktors Ets-1 sowie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Flk-1 analysiert (+). Es wurden Kontrollreaktionen ohne RT mitgeführt (-). Gleiche Mengen cDNA wurden durch 25 Zyklen für GAPDH bestätigt. Deutlich war Flk-1 durch die Überexpression von dnEts-1 reduziert.

Trotz der gehemmten Expression von Flk-1 wiesen beide Tumorgruppen ein vergleichbares Wachstum auf. Die Melanome, die dnEts-1 exprimierten, zeigten ein mittleres Gewicht von 524,66 (± 287) mg und unterschieden sich nicht signifikant vom mittleren Gewicht der Kontrollgruppe mit 481,8 ($\pm 128,01$) mg (Abb. III.2.7 A). Eine Veränderung der Vaskularisierung konnte trotz Reduktion der Flk-1 Expression histologisch nicht bestätigt werden (Abb. III.2.7 B).

Diese Ergebnisse bestätigten die Arbeitshypothese, dass die Hemmung von Ets-1 Signalwegen zur Inhibition der pathophysiologischen Tumorangiogenese bzw. des Tumorwachstums führt, nicht. Die Überexpression der Deletionsmutante dnEts-1 reichte nicht aus, um die Gefäßneubildung in Fibrosarkomen oder Melanomen zu hemmen und damit das Tumorwachstum negativ zu beeinflussen. Trotz Reduktion der Flk-1 Expression wurde in beiden Tumormodellen kein inhibitorischer Effekt auf die Angiogenese beobachtet. Ets-1 ist jedoch nur ein Faktor aus einem Komplex von Transkriptionsfaktoren, der die Expression angiogeneserelevanter Gene wie *flk-1* reguliert. Denkbar wäre, dass die Reduktion der Flk-1 Expression durch die Blockierung eines einzelnen Transkriptionsfaktors nicht ausreicht, um Flk-1 unter einen kritischen Schwellenwert zu regulieren, der für einen anti-angiogenen Effekt ausreicht.

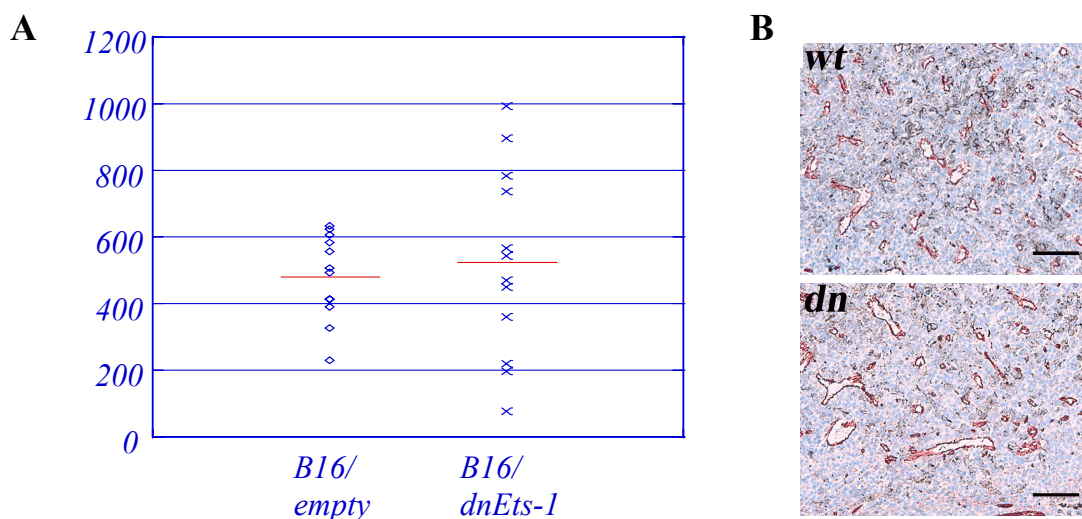


Abb. III.2.7 Wachstum subkutaner B16 Melanome 14 Tage p.i.

$1,5 \times 10^6$ B16 Melanoma Zellen wurden mit der gleichen Anzahl virusproduzierender GP+E86/empty (*wt*) oder GP+E86/dnEts-1 (*dn*) Zellen adulten Wildtyp Tieren subkutan co-injiziert. Vierzehn Tage post Injektion wurden die Tumoren entnommen und ausgewertet. **A.** Graphische Darstellung der ermittelten Gewichte in mg. **B.** Immunhistologische Färbung von PECAM-1 an Gefrierschnitten. In der Vaskularisierung der Tumoren beider Gruppen waren keine Unterschiede zu erkennen.

Balken: 100 μ m

III.2.2 Dominant-negatives HIF2 α

HIF2 α gehört zur Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α), die als heterodimere Transkriptionsfaktoren mit dem Bindungspartner ARNT (HIF1 β) die transkriptionelle Regulation einer Vielzahl angiogeneserelevanter Gene unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen kontrollieren. Da HIF2 α prädominant endothelzellspezifisch exprimiert wird, gilt er als intrinsischer Faktor der kompensatorischen Antwort unter Hypoxie, wie sie innerhalb des schnell proliferierenden Tumorgewebes auftritt. Im transgenen Tiermodell führte die Blockierung HIF-abhängiger Signalwege durch endothelzellspezifische Überexpression einer HIF2 α Deletionsmutante (dnHIF2 α) zu einer massiven Störung der Angiogenese und Herzentwicklung. Dies war auf eine inhibierte Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-2, Flt-1 und Flk-1 zurückzuführen (Licht et al., eingereicht). Diese Befunde könnten auch Relevanz für pathophysiologische Fragestellungen haben. Die endothelzellspezifische Blockierung von HIF-Signalwegen während der Tumorprogression mittels retroviraler Überexpression der Mutante dnHIF2 α könnte Auswirkungen auf die Tumorangiogenese haben. Diese Arbeitshypothese als mögliches anti-angiogenes Modell zu analysieren bleibt Ziel weiterer Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Konstrukt zur Generierung der Retroviren bereits kloniert und die dominant-negative Wirkung *in vitro* getestet. Innerhalb der 955 bp großen cDNA codierend für die Aminosäuren 24-325 von HIF2 α (Elvert et al., 2003) sind die beiden Transaktivierungsdomänen TAD C und TAD N, die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODD) sowie Teile der DNA-Bindungsdomäne bHLH deletiert (Abb. III.2.8 A). Durch die verbleibenden PAS A und B Domänen vermag dnHIF2 α mit der β -Untereinheit zu dimerisieren.

Zur Generierung des retroviralen Expressionsplasmids wurde die cDNA für dnHIF2 α mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoRI/XhoI* aus dem Plasmid pcDNA3-HIF2dnFlag (Elvert et al., 2003) isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des pLXSN Vektors kloniert. Die Aktivität des generierten Konstruktes pLXSN-dnHIF2 α wurde durch transiente Transfektion in die Affen-Nieren-Zelllinie COS-1 immunfluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Hierzu wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch gegen das C-terminale Signalepitop FLAG detektiert. Deutlich ist die nukleäre Lokalisation der Deletionsmutante zu erkennen (Abb. III.2.8 B).

Um dnHIF2 α *in vitro* funktional zu charakterisieren und den Einfluss auf einen HIF-abhängigen Promotor zu untersuchen, wurden Luziferase-Reportergen-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde dnHIF2 α unter der retroviralen 5'LTR in den Zelllinien HUE und A293 überexprimiert und das Reporter-Plasmid pFlk-1-Luc co-transfiziert (Kappel et al., 1999). Dieser Promotor enthält zwei funktionale HIF-ähnliche Bindungsstellen (HBS) (Elvert et al., 2003). Die Zellen wurden 24-48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Luziferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Dazu wurde die basale Aktivität gleich 1 gesetzt, so dass alle weiteren Werte relativ zu diesem Basalwert dargestellt wurden. In den transfizierten HUE Zellen wurde die basale Aktivität des Reportergens durch Expression von pLXSN-dnHIF2 α um 13% reduziert. Die Transfektion von pCMV-HIF2 α stimulierte die Aktivität des Promotors um das 3,8-fache.

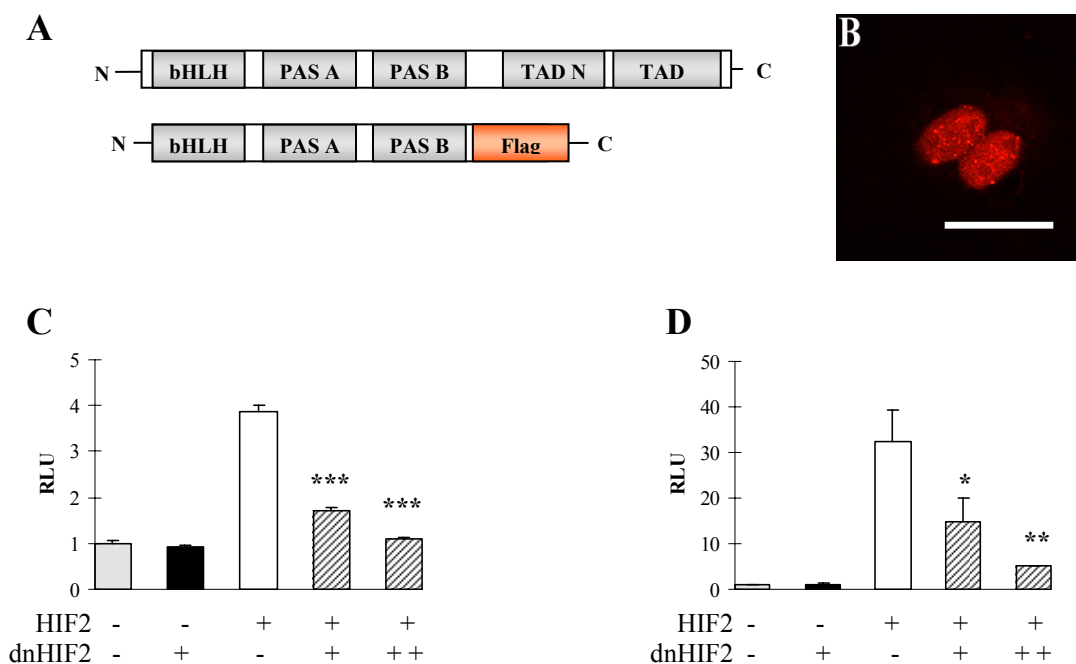


Abb. III.2.8 Struktur und Funktion der dnHIF2 α Mutante *in vitro*

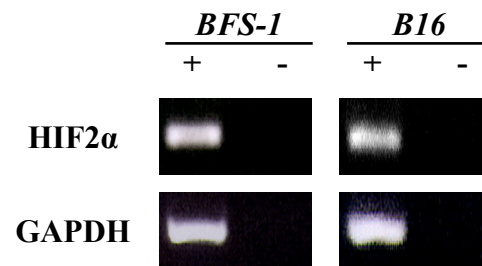
A. Domänenstruktur von HIF2 α und dnHIF2 α . Die Transaktivierungsdomänen (TAD N und C) und die bHLH Domäne wurden in dnHIF2 deletiert. **B.** Lokalisation von dnHIF2 α in COS-1 Zellen. Die Zellen wurden mit dem retroviralen Konstrukt transfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das FLAG Epitop durchgeführt. dnHIF2 α war ausschließlich im Zellkern lokalisiert. **C/D.** Luziferase-Reportergen-Experimente. *Flk-1* Promotor-Luziferase wurde in HUE (C) und A293 Zellen (D) transfiziert. Durch Expression von HIF2 wurde der *flk-1* Promotor stimuliert, durch Co-Expression von HIF2 α wurde die Stimulierung signifikant inhibiert. *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0001

Balken: 20 μ m

Durch Co-Transfektion gleicher Mengen von pLXSN-dnHIF2 α und pCMV-HIF2 α wurde die HIF2-abhängige Stimulation signifikant reduziert, nämlich auf 44 % der Basalaktivität ($p < 0,0001$). Ein Überschuss von pLXSN-dnHIF α resultierte in einer annähernd vollständigen Reduzierung auf basales Level (Abb. III.2.8 C). Auch in der zweiten verwendeten Zelllinie konnte der inhibitorische Einfluss der Deletionsmutante auf den *flk-1* Promotor gezeigt werden. Exprimierten A293 Zellen dnHIF2 α , so konnte die Basalaktivität des Reportergens um 8 % reduziert werden. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors HIF2 α resultierte in einer 32-fachen Steigerung der Promotoraktivität. Wurden HIF2 α und die Deletionsmutante dnHIF2 α in die Zelllinie co-transfiziert, so führte dies zu einer signifikanten Reduzierung der Promotoraktivität in Abhängigkeit der Plasmidkonzentrationen. Bei gleichen Mengen der Plasmide wurde die HIF2 α induzierte Stimulierung des *flk-1* Promotors um 54 % gehemmt ($p < 0,05$). Allerdings konnte selbst durch einen Überschuss von pLXSN-dnHIF2 α keine vollständige Reduzierung auf basales Niveau erreicht werden. Die HIF2 α induzierte Stimulierung wurde maximal um 82 % reduziert ($p < 0,005$; Abb. III.2.8 D).

Diese *in vitro* Experimente lassen den Schluss zu, dass die generierte dnHIF2 α Mutante mit Wildtyp HIF2 α konkurriert und die Aktivierung von an der Tumorangio-genese beteiligter Zielgene wie z.B. *flk-1* signifikant inhibieren kann.

In zukünftigen Arbeiten sollte das Konstrukt pLXSN-dnHIF2 zur Generierung von Retroviren verwendet werden. Entsprechend des Versuchablaufs der Transkriptionsfaktormutante dnEts-1 sollen diese den Gentransfer *in vivo* vermitteln. Die Auswirkungen auf die Neovaskularisierung von Tumoren durch Blockierung von HIF-Signalwegen durch die retrovirale Überexpression von dnHIF2 α soll durch das Co-Injektionsmodell an Fibrosarkomen und Melanomen untersucht und als mögliches anti-angiogenes Modell analysiert werden. Die Expression des endogenen Wildtyp Transkriptionsfaktors HIF2 α konnte bereits in beiden Tumoren mittels RT-PCR bestätigt werden (Abb. III.2.9).

**Abb. III.2.9 RT-PCR Analyse von BFS-1 Fibrosarkomen und B16 Melanomen**

1,5x10⁶ BFS-1 Fibrosarkoma Zellen bzw. 1,5x10⁶ B16 Melanoma Zellen wurden mit gleicher Anzahl retrovirusproduzierenden GP+E86/empty Zellen adulten Wildtyp Mäusen subkutan co-injiziert. 14 Tage p.i. wurden die Tumoren präpariert und RNA isoliert. Durch semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR wurde die Expression des endogenen Transkriptionsfaktors HIF2 α analysiert (+). Kontrollreaktionen ohne RT wurden mitgeführt (-). Gleiche Mengen cDNA wurden bestätigt durch 25 Zyklen für GAPDH.

IV. Diskussion

IV.1 Die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin für die Therapie und Diagnostik von Tumoren

Derzeit findet die Avidin-Biotin-Technologie Anwendung bei einer Vielzahl pharmakologischer oder diagnostischer Fragestellungen und gehört zu einer der gängigsten Methoden der Krebstherapie. In der Regel werden hierzu monoklonale Antikörper (mAb) gerichtet gegen ein Epitop des Tumorgewebes verwendet, die als Transporter das therapeutische Agens zum Zielgewebe führen. Dabei sind in der Immuntherapie die mAb direkt mit dem therapeutischen Liganden, einem Zytokin, gekoppelt. Tiermodelle und klinische Studien mit solchen Immunzytokinen bestehend aus einem mAb und IL-2 (Xu et al., 2000), IL-12 (Peng et al., 2001) oder GM-CSF (Dela Cruz et al., 2000) liegen vor und zeigten eine effiziente therapeutische Wirksamkeit durch Verstärkung der antitumoralen Immunität. In der Radioimmuntherapie und –diagnostik hingegen fällt die Wirkung radionuklidgekoppelter mAb pharmakokinetisch ungünstig aus und führte zur Entwicklung Avidin-Biotin-basierender „pretargeting“ Modelle (zusammengefasst in Boerman et al., 2003).

Hierbei wird zunächst der Tumor durch Bindung eines mAb markiert. Dieser ist biotinyliert (mAb-b) und vermag im zweiten Schritt Avidin bzw. Streptavidin (Av bzw. sAV) zu binden. Erst im dritten Schritt erfolgt die Verabreichung des biotinylierten Konjugates (Abb. I.3). Die Weiterentwicklung dieses Systems zur Erhöhung der Spezifität beruht auf den unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften von Av und sAv. Während Av nach intravenöser Applikation mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von $t_{1/2} < 1$ min schnell in metabolisierenden Organen akkumuliert, kann es zum Abfangen ungebundener mAb-b aus der Zirkulation dienen, die somit zügig durch die Niere ausgeschieden werden (Schritt 2). Streptavidin hingegen weist deutlich längere Zirkulationszeiten auf (Rosebrough, 1993; Schechter et al., 1990) und ist damit optimal für die Avidinylierung des mit einem mAb-b markierten Tumors (Schritt 3). Überschüssiges sAV wiederum wird durch biotinyliertes Albumin abgefangen und ausgeschieden (Schritt 4). Zuletzt wird das biotinylierte Radionuklid verabreicht und akkumuliert mit hoher Spezifität im Zielgewebe (Schritt 5).

Dosimetrische Analysen solcher radioimmuntherapeutischer Modelle im Tierversuch zeigten eine bis zu 28-fache Steigerung der lokalen Dosis im Zielgewebe im Vergleich zur direkten Applikation eines ^{90}Y -markierten Antikörpers (Axworthy et al., 2000).

Klinische Studien bestätigten die pharmakokinetisch günstigere Verteilung von Radionukliden sowie die effektive Wirksamkeit der „pretargeting“ Methode (Grana et al., 2002; Magnani et al., 2000; Paganelli et al., 1999; 2001). Diese fanden bereits Anwendung in der Diagnostik von Lungen- und Ovarialkarzinomen (Crippa et al., 1995; Kalofonos et al., 1990) sowie von colorektalen Krebserkrankungen (Paganelli et al., 1991) und Gliomen (Paganelli et al., 1999). Prinzipiell zeigten alle Studien, dass Avidin-Biotin-basierende Methoden vom Organismus gut toleriert werden (Axworthy et al., 2000; Stella et al., 1994). Der wesentliche limitierende Faktor jedoch ist die Interaktion zwischen mAb und Epitop auf der Oberfläche des Tumors. Der systemisch verabreichte mAb muss zunächst zum tumoralen Epitop gelangen, wobei sich ein hoher Tumorrinnendruck negativ auf den Penetrationsindex des mAb ins Tumorgewebe auswirkt. Zudem müssen für jeden therapeutischen oder diagnostischen Ansatz neue mAb generiert werden. Immunreaktionen sind nicht ausgeschlossen, die zur Neutralisierung und/oder zum raschen Abbau des mAb führen.

Eine viel versprechende Alternative zu herkömmlichen Avidin-Biotin-basierenden Methoden bei klinischen Fragestellungen sind die Fusionsproteine Lodavin und Scavidin (Lehtolainen et al., 2002; 2003). Wie auch bei den „pretargeting“ Modellen basiert im Lodavin/Scavidin-System der zielgerichtete Transport biotinylierter Konjugate auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin zu Biotin, die mit einer Dissoziationskonstante von $K_d=10^{-15}$ M (Green, 1975) annähernd irreversibel ist (Rosano et al., 1999). Diese nicht-kovalenten Bindungseigenschaften können dahingehend genutzt werden, um nach einer gewebe- und/oder zellspezifischen Expression der Fusionsproteine eine Anreicherung systemisch verabreichter biotinylierter Moleküle im Zielgewebe zu erreichen. Durch die spezifische Expression der Fusionsproteine entfällt der kritische Schritt der Antigen-Antikörper-Bindung zur Markierung des Tumors. In Abhängigkeit des biotinylierten Liganden kann das System für diagnostische oder therapeutische Ansätze Verwendung finden. Damit wäre der Einsatz von nur niedrigen Konzentrationen des Konjugates erforderlich. Toxische Nebenwirkungen sowie Strahlenbelastungen für den Patienten würden minimiert und lokale biologische Effekte selektiv und lokal erhöht werden. Im Vergleich zu konventionellen „pretargeting“ Techniken reduziert sich die Anwendung des Lodavin/Scavidin-Systems auf eine 2-Schritt Methode: Der spezifischen Expression des Fusionsproteins mittels Gentransfer im Zielgewebe (Schritt 1) folgt die systemische Applikation des biotinylierten Konjugates (Schritt 2).

In der vorliegenden Arbeit sollten Lodavin und Scavidin zellspezifisch während der Entwicklung experimenteller Tumoren exprimiert werden. Aufgrund der genetischen Instabilität und hohen Mutationsrate von Tumorzellen kommt es im Rahmen konventioneller Chemotherapien oftmals zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber dem eingesetzten Therapeutikum, so dass der Therapieerfolg begrenzt bleibt. Im Gegensatz dazu weisen Endothelzellen als normale diploide Zellen eine deutlich höhere genetische Stabilität und eine nur geringe Mutationsrate auf. Therapeutische Strategien, die sich gezielt gegen Endothelzellen von Tumorgefäßen richten, sollten in weitaus geringerem Maße zur Ausbildung von Resistenzen führen. Daher zielte der wesentliche Teil der Arbeit auf die endothelzellspezifische Expression der Fusionsproteine und umfasste die Generierung transgener Mäuse sowie den retroviralen Gentransfer im Wildtyp Tier. Weiterhin zielte die Arbeit auf eine induzierbare Expression der Fusionsproteine in Tumorzellen. Durch systemische Applikation biotinylierter Liganden sollten Bindungsstudien bzw. Therapien an diesen *in vivo* Modellen durchgeführt und als neuartige Methode zur Behandlung bzw. Diagnostik maligner Erkrankungen diskutiert werden. Ark Therapeutics, London, sowie die Arbeitsgruppe von Seppo Ylä-Herttuala am I.A. Virtanen Institut der Universität Kuopio, Finnland, sollten hierzu biotinylierte Chemotherapeutika bzw. Radionuklide generieren.

Um Lodavin und Scavidin spezifisch in Endothelzellen des Gefäßsystems transgener Tiere zu exprimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit regulatorische Elemente des murinen *VEGF Rezeptor-2 (flk-1)* Gens verwendet. Hierzu wurden das 939 bp Promotorfragment in Kombination mit einem 2.3 kbp Enhancerfragment des 1. Introns genutzt. Bereits zuvor wurde in unabhängigen Studien gezeigt, dass diese Elemente (*flk-1 p/e*) die Expression der Reportergene LacZ (Kappel et al., 1999; Licht et al., 2004) oder des Grün-Fluoreszierenden Proteins (GFP) (Hirai et al., 2003) in transgenen Mäusen und sich differenzierenden embryonalen Stammzellen regulieren. Dabei ist das Enhancerelement weitgehend für die Endothelspezifität verantwortlich, während das Promotorfragment die Expressionsstärke vermittelt (Kappel et al., 1999). In differenzierenden Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die verwendeten regulatorischen Sequenzen nur in reifen, VE-Cadherin positiven Endothelzellen aktiv sind, nicht aber in frühen Flk-1 positiven mesodermalen Vorläufern. Die Expression des Reportergens im Tier wurde in Bereichen des extraembryonalen Mesoderms beginnend an Tag E7,8 während der Embryonalentwicklung beobachtet und trat somit etwas später als die des endogenen Flk-1 auf. Auch im Embryo beschränkte sich die Expression auf

reife Endothelzellen, wurde aber nicht auf hämatopoetische Zellen oder Vorläufer der Endothelzelllinie wie den Hämangioblasten detektiert. Analog zur Expression des endogenen *flk-1* wurde die des Reportergens in adulten Tieren und den meisten Organen herunter reguliert. Untersuchungen an verschiedenen experimentellen Tumormodellen bestätigten die *flk-1* Promotor- und Enhancersequenzen als ausreichend für eine starke und spezifische Reportergenexpression im Tumorendothel (Heidenreich et al., 2000). Damit bietet der verwendete *flk-1p/e* optimale Eigenschaften zur Expression von Genen, die im Rahmen einer anti-angiogenen Therapie oder zur diagnostischen Darstellung von Tumorgefäßen Verwendung finden können. Promotoren anderer endothelspezifisch exprimierter Gene wie VE-Cadherin (Gory et al., 1999), von Willebrand Faktor (vWF) (Jahroudi und Lynch, 1994), Tie-2 (Schlaeger et al., 1995; 1997) oder Endothelin-1 (Harats et al., 1995) sind für die gezielte Expression therapeutischer Gene im Tumorendothel nicht einsetzbar, da diese Gene konstitutiv auch unter physiologischen Bedingungen ubiquitär im Gefäßendothel exprimiert werden. Darüber hinaus ist nicht geklärt, ob eine Stimulation der Expression dieser Gene im Tumorendothel vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgene Tiere generiert und charakterisiert. In beiden Linien wurde die Expression der Fusionsproteine während der Embryonalentwicklung mittels immunhistologischer Methoden bestätigt. So wiesen 45-60% aller embryonalen Gefäße eine Expression von Lodavin auf (Abb. III.1.3). Einzige Ausnahme waren Endothelien der Lunge. In keinem der analysierten Embryonen konnte eine Expression des Transgens in diesem Gewebe bestätigt werden. Die Anzahl Scavidin positiver Gefäße lag bei 35-50 % (Abb. III.1.4). Durch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Endothelzellspezifität der Expression beider Fusionsproteine bestätigt werden. Sie trat in Co-Lokalisation mit den Endothelzellmarkern Flk-1 und PECAM-1 auf (Abb. III.1.5). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Expressionsstärken der Fusionsproteine und das Ausbleiben einer Expression von Lodavin in Endothelien der Lunge könnte der Integrationsort des Transgens ins Genom der Gründer sein. Dieser kann bei der Generierung transgener Tiere nach der angewandten Methode (siehe Kapitel II.10.1) nicht beeinflusst werden, so dass benachbarte regulatorische Elemente Einfluss auf die Expression des eingebrachten Gens nehmen können. So wirken regionale Enhancerelemente positiv, Silencerelemente oder dichte Chromatinstrukturen negativ auf die Transkription des Transgens. Auch die Anzahl der integrierten Kopien des Transgens beeinflussen die Expressionsstärke, wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Für Säugerzellen ist Biotin (Vitamin H) essentiell. Durch seine CO₂-bindende Eigenschaft dient es als prosthetische Gruppe vier verschiedener Biotin-abhängiger Carboxylasen und spielt eine entscheidende Rolle in metabolischen Prozessen wie der Glukoneogenese, der Synthese von Fettsäuren und Stoffwechselprozessen von Aminosäuren (Moss und Lane, 1971). Zellulär liegt Biotin zu mehr als 90% zytoplasmatisch oder in Mitochondrien vor. Weniger als 1% ist nukleär lokalisiert (Stanley et al., 2001). Angaben zur Serumkonzentration und des Verhältnisses von gebundenem zu ungebundenem Biotin variieren. Mit einer Konzentration von ca. 16 nM liegt der endogene Serumbiotinspiegel der Maus jedoch deutlich über dem des Menschen (0,4-0,9 nM). Hiervon liegen ca. 80% frei, 12% kovalent und 7% reversibel an α - und β -Globuline sowie an Albumin gebunden vor (Mock und Malik, 1992). Andere hingegen postulieren eine komplette Bindung von Serumbiotin an die Biotinidase (Chauhan und Dakshinamurti, 1988). Durch Expression der Fusionsproteine während der Embryonalentwicklung ist eine Akkumulierung des Serumbiotins im Endothel nicht auszuschließen, was Veränderungen im vaskulären Phänotyp hervorrufen könnte. Der Vergleich von transgenen mit Wildtyp Embryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung zeigte jedoch keine Auffälligkeiten im Phänotyp. Speziell in der Morphologie und Dichte des Gefäßsystems wurden keine Unterschiede beobachtet. Die Tiere beider transgener Linien entwickelten sich wie Wildtyp Tiere und zeigten eine den Mendelschen Gesetzen folgende Vererbung der Transgene an ihre Nachkommen.

Die Charakterisierung adulter Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgener Tiere bestätigte, dass der *flk-1p/e* im adulten, nicht aktiven Endothel keine Aktivität aufwies. So wurde in keinem der analysierten Organe eine Scavidin Expression gefunden. Auch die Mehrzahl der untersuchten Organe aus Flk-1-Lodavin transgenen Tieren war bzgl. der Transgenexpression negativ. Einzige Ausnahme war das Gefäßsystem der Milz. Hier zeigte sich, dass ca. 70% der Gefäße der roten Pulpa positiv für Lodavin waren. Gefäße der Milzfollikel wiesen nur selten eine Expression auf (Abb. III.1.6). Diese Beobachtung ist konsistent mit Daten vorheriger Arbeiten. Histologische Analysen adulter Flk-1-LacZ Reportermäuse zur Charakterisierung der *flk-1p/e* bestätigten eine Transgenexpression in Endothelien der Milz (Kappel et al., 1999). Damit ist die beobachtete Lodavinexpression in adulten Tieren dieser Linie wahrscheinlich auf die verwendeten *flk-1* regulatorischen Sequenzen zurückzuführen. Das Ausbleiben einer Expression in adulten transgenen Tieren der Flk-1-Scavidin transgenen Linie spricht für einen zusätzlichen Einfluss des Integrationsorts und der Anzahl der Kopien des Plasmids im Genom.

Um die endothelzellspezifische Expression der therapeutischen Gene während der Tumorentwicklung zu analysieren, wurden die generierten Linien für subkutane Injektionen von BFS-1 Fibrosarkomen verwendet. Bereits nach 4 bis 7 Tagen hatten sich solide Tumoren gebildet. Der Nachweis beider Transgene mittels RT-PCR demonstrierte, dass die Neovaskularisierung der Fibrosarkome zur Expression der Fusionsproteine führte (Abb. III.1.7). Histologische Analysen bestätigten, dass die Tumoren gut vaskularisiert waren und Lodavin und Scavidin im Gefäßsystem exprimierten (Abb. III.1.8). Damit wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vivo* die genregulatorischen Elemente von *flk-1* für die spezifische Expression von Genen genutzt, die von therapeutischem oder diagnostischem Nutzen bei Tumorerkrankungen sein können. Die eingesetzten *flk-1p/e* Sequenzen zeigten bereits im frühen Stadium der Tumorangiogenese eine Aktivität, die die endothelspezifische Expression der Gene *Lodavin* und *Scavidin* regulierten. Die Verteilung der Expression beider Fusionsproteine an Tag 4 nach Tumorzelltransplantation wurde vornehmlich in einsprossenden Gefäßen der Tumorperipherie beobachtet. Dieser Befund stimmt mit der Hypothese überein, dass die Neovaskularisierung im Randgebiet des wachsenden Tumors durch Induktion der Flk-1 Expression in Endothelzellen normaler Blutgefäße beginnt. Vergleiche der Transgenexpression mit der von Flk-1 an Tag 4 oder 7 nach Tumorzellinokulation zeigten, dass in beiden Linien 10-15 % aller Tumorgefäße positiv für die therapeutischen Proteine waren. An Tag 14 waren nur noch in vereinzelt Gefäßen die Fusionproteine detektierbar (Daten nicht gezeigt). Der geringere Anteil an Transgen positiver Tumorgefäße zu Flk-1 positiven Endothelien beruht nicht auf den verwendeten *flk-1p/e*, sondern auf der Methode zur Generierung der transgenen Tiere, bei der sich der Integrationsort des eingebrachten Gens nicht bestimmen lässt. Expressionsanalysen des Reportergens *lacZ* im Tumorgewebe von BFS-1 Fibrosarkomen aus Flk-LacZ Mäusen zeigten eine weitgehend übereinstimmende Expressionsstärke und -verteilung mit der von Flk-1 (Heidenreich et al., 2000).

Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung bestätigte, dass Lodavin in Co-Lokalisation mit den Endothelzellmarkern Flk-1 und PECAM-1 vorlag (Abb. III.1.8 G-L). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte Scavidin nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Expressionsstärke von Scavidin sein. Zudem sind Unterschiede im intrazellulären Ablauf der Proteinreifung beider Moleküle bekannt, die sich auf die Verfügbarkeit der Fusionproteine auf der Zelloberfläche und damit Detektierbarkeit auswirken. Die funktionale Struktur des endozytotischen Scavenger-Rezeptor A (SR-A) ist ein trimeres Molekül. Es konnte gezeigt werden, dass die

Trimerisierung für den effizienten Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat notwendig ist, damit der Rezeptor als reifes Protein auf die Zelloberfläche gelangt (Penman et al., 1991). Ausgehend von der trimeren Quartärstruktur des SR-A wurde angenommen, dass Scavidin ebenso als Trimer seine Funktion zur Bindung von Liganden ausübt (Ashkenas et al., 1993). Quervernetzungsstudien demonstrierten, dass der Großteil der Fusionsproteine als Tetramer in der Zelle vorliegt (Lehtolainen et al., 2002), was auf die Avidindomäne zurückzuführen war. Avidin ist ein basisch geladenes Glykoprotein, das aus vier identischen Untereinheiten besteht (Green, 1975). Innerhalb des Fusionsproteins scheint die Avidindomäne löslich zu verbleiben und bedingt die Zusammenlagerung der Scavidinmoleküle zu Tetrameren. Untersuchungen zur Lokalisation von Scavidin innerhalb der Zelle ergaben, dass nur ein geringer Anteil der exprimierten Proteine an der Oberfläche erschien. Der Großteil verblieb in vesikulären Strukturen des Zytoplasmas, die sich meist in perinukleären Regionen ansammelten (Lehtolainen et al., 2002). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass durch die komplexere Quartärstruktur des Fusionsproteins im Vergleich zu SR-A der Prozess der Exozytose erschwert ist und Scavidin im Zytoplasma sequestriert. Die Quartärstruktur des LDL-Rezeptors hingegen ist ein Monomer. Innerhalb von Lodavin bedingt auch hier die Avidindomäne die Zusammenlagerung zu Tetrameren (Lehtolainen et al., 2003). Diese erscheinen jedoch vorherrschend auf der Zelloberfläche, wie Aufnahmen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dieser Arbeit demonstrierten (Abb. III.1.6 D). Diese zellbiologischen Daten könnten eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Expressionsanalysen im Tumormodell bieten. In der semiquantitativen RT-PCR wurde die mRNA beider Fusionsproteine in etwa gleichen Mengen detektiert. Auf Proteinebene erschien in der Histologie die Expression von Scavidin schwächer als die von Lodavin und war schließlich immunfluoreszenzmikroskopisch aufgrund der geringeren Sensitivität der Methode nicht mehr nachzuweisen. Damit scheint Lodavin prinzipiell für diagnostische oder therapeutische Anwendungen geeigneter zu sein. Die einfachere Struktur des LDL-Rezeptoranteils innerhalb von Lodavin begünstigt die Prozessierung und Einlagerung des Fusionsproteins in die Zellmembran, die für die Akkumulierung und Internalisierung eines biotinylierten Liganden essentiell ist.

Auch im zweiten Tumormodell entwickelten sich nach subkutaner Co-Injektion von BFS-1 Fibrosarkoma Zellen mit virusproduzierenden GP+E86/Lodavin Zellen gut vaskularisierte Tumoren, wie die immunhistologische Färbungen unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Endothelzellmarker Flk-1 und PECAM-1 zeigten (Abb.

III.1.13 A/B). Die Expression von Lodavin trat ausschließlich gefäßassoziiert auf (Abb. III.1.13 C) und konnte in der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung in 10-15% der Flk-1 und PECAM-1 positiven Gefäßen des Tumorstromas bestätigt werden (Abb. III.1.13 D-I). Damit wurde in dieser Arbeit erstmals histologisch gezeigt, dass der retrovirale Gentransfer im Co-Injektionsmodell von BFS-1 Fibrosarkoma Zellen ausschließlich zu einer endothelzellspezifischen Expression des heterologen Gens führt. Der Virus infiziert selektiv einsprossende Gefäße. Als zusätzlicher Beweis für die Endothelzellspezifität des Modells wurde *in vitro* bestätigt, dass BFS-1 Zellen nach Infektion mit Lodavin-codierenden Retroviren nicht zur Expression des Fusionsproteins fähig waren (Abb. III.1.13 J).

In beiden endothelzellspezifischen Modellen exprimierten 10-15% der Tumorgefäße die Fusionsproteine. Dies erscheint für einen therapeutischen Ansatz niedrig. Eine Endothelzelle ist jedoch für die Versorgung von 50 bis 100 Tumorzellen verantwortlich (Folkman, 1997). Somit kann im Rahmen einer anti-angiogenen Therapie die Zerstörung eines einzigen funktionalen Gefäßes zur Destruktion eines ganzen Tumoreals führen. *In vivo* Studien zeigten, dass bereits die gezielte und selektive Eliminierung einzelner endothelassoziierter Zellen für eine signifikante Inhibierung des Tumorwachstums ausreicht (De Palma et al., 2003). In dieser Studie wurde das Prodrug-konvertierende System der Herpes simplex Virus Thymidinkinase/Ganzyklovir (HSV-tk/GCV) verwendet. Die Kinase wurde unter regulatorischen Elementen des *tie-2* Gens in hämatopoetischen Stammzellen überexprimiert, die die Aktivierung der nicht-toxischen Medikamentvorstufe GCV („prodrug“) in das toxische Chemotherapeutikum („drug“) katalysierte. Das toxische Agens wurde durch zelluläre Kontakte („gap junctions“) an benachbarte Endothelzellen weitergegeben, die folglich ebenso den programmierten Zelltod eingingen („bystander Effekt“) und zur Hemmung der Tumorangiogenese führten. Auch in einem zellulären 3-dimensonalen *in vitro* Modell, dass annähernd die *in vivo* Situation innerhalb eines Tumors widerspiegelt, führte die selektive Überexpression des Prodrug-konvertierenden Enzyms Nitroreduktase in Endothelzellen nach Applikation der Medikamentvorstufe CB1954 diese in die Apoptose. Durch Diffusion des toxischen Agens starben schließlich auch die angrenzenden Melanomazellen ab (Benouchan et al., 2003). Basierend auf diesen Studien wäre es denkbar, dass die therapeutische Wirkung eines verabreichten Konjugates in den hier vorgestellten Modellen größer ist als die Expressionsstärke bzw. die Anzahl Fusionsprotein positiver Endothelzellen vermuten lässt. Die Eigenschaften des verabreichten biotinylierten therapeutischen Agens, wie

dessen Toxizität, Stabilität oder Fähigkeit zur Diffusion, scheinen einen erheblichen Einfluss auf den Therapieerfolg zu nehmen.

Das dritte in dieser Arbeit etablierte Modell basierte auf der induzierbaren, tumorzellspezifischen Expression der Fusionsproteine. Nach Inokulation der BFS-1/Scavidin Zellen entwickelten sich gut vaskularisierte Fibrosarkome. Eine regulierbare Expression von Scavidin konnte bestätigt werden. Diese trat ausschließlich tumorzellspezifisch und in Abhängigkeit des Induktors Doxyzyklin auf (Abb. III.1.17).

Durch Bestimmung der Tumormasse wurde in allen drei Tumormodellen der Einfluss der Expression von Lodavin bzw. Scavidin auf das Tumorwachstum analysiert. Während an Tag 7 nach Transplantation im transgenen Tiermodell kein wesentlicher Unterschied im Tumorwachstum beobachtet werden konnte, wiesen Tumoren, die Lodavin endothelzellspezifisch exprimierten, 14 Tage nach Zellinokulation ein signifikant höheres Gewicht auf ($p < 0,01$). So lag das mittlere Gewicht um das ~2,5-fache über dem von Kontrolltumoren oder solchen aus Flk-1-Scavidin transgenen Mäusen (Abb. III.1.9 und III.1.10). Neben der Masse war auch das Volumen erhöht (Daten nicht gezeigt). Konsistent mit diesen Ergebnissen wiesen auch Lodavin-exprimierende Fibrosarkome des Co-Injektionsmodells ein signifikant höheres Gewicht auf ($p < 0,0001$). Das in der statistischen Auswertung ermittelte mittlere Gewicht lag ebenso um das ~2,5-fache über dem der Kontrollgruppe (Abb. III.1.14). Wie die Expression von Lodavin beider endothelzellspezifischer Modelle, so nahm auch die tumorzellspezifische Expression von Scavidin einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum experimenteller Fibrosarkome ($p < 0,01$). Das mittlere Gewicht dieser Tumoren lag um das ~1,5-fache über dem von Kontrolltumoren (Abb. III.1.18). Ein solcher Effekt konnte im endothelzellspezifischen Tumormodell Flk-1-Scavidin transgener Tiere nicht beobachtet werden und könnte auf das Expressionslevel zurückzuführen zu sein. In diesem Modell zeigten 10-15% der Tumorgefäße eine Reaktivität für Scavidin. Im tumorzellspezifischen Modell hingegen exprimierten alle Fibrosarkoma Zellen Scavidin. Damit scheint die Expressionsstärke für das gesteigerte Tumorwachstum verantwortlich zu sein und stellt den Effekt der beeinträchtigten intrazellulären Proteinreifung in den Hintergrund. Über den Einfluss von Doxyzyklin auf das Wachstum experimenteller Tumoren liegen derzeit keine publizierten Daten vor. Die beobachtete Zunahme des Wachstums von Kontrolltumoren durch Zugabe von 100 µg/ml Dox ins Trinkwasser der Tiere bleibt ungeklärt. *In vitro* konnte ein Einfluss von Doxyzyklin auf das Proliferationsverhalten kultivierter Zellen nicht bestätigt werden (Abb. III.1.19).

Eine mögliche Erklärung für die Wachstumszunahme der Lodavin- bzw. Scavidin-exprimierenden Tumoren könnte die gesteigerte Aufnahme von endogenem Biotin sein. Derzeit wird der Einfluss von Biotin auf das Proliferationsverhalten von Zellen kontrovers diskutiert. Während die Kultivierung humaner Zellen aus Choriokarzinomen auf eine direkte Korrelation des Proliferationsindex mit der im Medium enthaltenen Biotinkonzentration wies (Crisp et al., 2004), zeigten humane Keratinozyten (Limat et al., 1996) oder murine Splenozyten (Baez-Saldana et al., 1998) keine proliferativen Veränderungen als Antwort auf erhöhte Biotinkonzentrationen. Auch an humanen mononukleären Blutzellen konnte in Zellkultur keine Abhängigkeit der Teilungsrate von Biotin gezeigt werden. *In vivo* hingegen reagierten diese Zellen mit einem verminderten Proliferationsverhalten als Antwort auf eine erhöhte Serumbiotinkonzentration (Zempleni und Mock, 1998). Eine mögliche Erklärung für die Abweichung zwischen *in vitro* und *in vivo* generierter Daten könnten Unterschiede im Mikromilieu der Zelle sein, die die Wirkungsweise von Biotin beeinflussen. Zudem scheint der Einfluss von Biotin vom Zelltyp abhängig zu sein und wurden Speziesunterschiede festgestellt. Während in Ratten die Erhöhung des Biotinspiegels durch Nahrungsergänzung eine Zunahme der Phagozytoseaktivität des retikuloendothelialen Systems zur Folge hatte (Petrelli et al., 1974), trat in Schweinen eine Suppression der humoralen Immunantwort auf (Kornegay et al., 1989). Schon früh wiesen einige Studien daraufhin, dass Biotin Einfluss auf das Immunsystem durch die transkriptionelle Regulation von Genen der Zytokinfamilie und deren Rezeptoren nehmen kann (Cowan et al., 1979; Petrelli et al., 1981; Rabin, 1983). Auch eine direkte Abhängigkeit zwischen Biotinkonzentration und der Expression von Onkogenen wie N-myc, c-myc, N-ras und raf konnte an kultivierten Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms bestätigt werden (Scheerger und Zempleni, 2003). Durch die DNA-Mikroarray Technik wurden mittlerweile mehr als 200 Gene gefunden, deren Expression in Zusammenhang mit Biotin stehen. Derzeit werden drei Mechanismen der Biotin-abhängigen Genregulation diskutiert. So beschrieben Solorzano-Vargas et al. eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch Biotinyl-Adenosinmonophosphat (Solorzano-Vargas et al., 2002). Ein negativ-regulatorischer Einfluss von Biotin auf die NFκB-abhängige Signaltransduktion konnte demonstriert werden (Rodriguez-Melendez und Zempleni, 2003) wie auch die Konjugation von Biotin an DNA-assozierte Histone in humanen Zellen (Stanley et al., 2001). Analog zur Acetylierung oder Ubiquitinierung scheint die Biotinylierung von Histonen zu Remodellierungsprozessen der Chromatinstruktur zu führen und damit die transkriptionelle Aktivität der DNA zu

beeinflussen. Ob sich dies positiv oder negativ auf die Genexpression auswirkt, bleibt Gegenstand der Forschung.

Derzeit ist nicht auszuschließen, dass es durch die Expression von Lodavin und Scavidin während des Tumorwachstums zu einer intrazellulär erhöhten Biotinkonzentration kommt. In wieweit dies Einfluss auf die Biologie der Endothel- oder Tumorzelle nimmt, Prozesse wie die oben beschriebenen eintreten und in Zusammenhang mit dem verstärkten Tumorwachstum zu bringen sind, bleibt abzuklären. Ein durch Bindung endogenen Serumbiotins an die Fusionsproteine ausgelöster Signalprozess scheint jedoch unwahrscheinlich. Für die verwendeten Anteile des LDL- bzw. Scavenger-Rezeptors innerhalb von Lodavin und Scavidin sind keine signaltransduzierenden Eigenschaften bekannt. Sie bedingen lediglich die Einlagerung der Fusionsproteine in die Membran und die Internalisierung des gebundenen Liganden. Makroskopische und mikroskopische Unterschiede der Tumorgewebe aus allen drei Modellen konnten im Vergleich mit Kontrolltumoren nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ausbildung von Tumorgefäßen, deren Dichte oder Morphologie sowie die Häufigkeit von Nekrosen trat unabhängig von der Expression der Fusionsproteine auf. *In vitro* konnte kein Einfluss von Biotin auf das Proliferationsverhalten von BFS-1 bzw. BFS-1/Scavidin Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ferner bleibt unklar, warum sich im Phänotyp transgener Embryonen und in der Milz adulter Flk-1-Lodavin transgener Mäuse keine Unterschiede zu Wildtyp Tieren zeigten. Obgleich die Expression embryonal deutlich stärker war als während der Tumorangiogenese, entwickelten sich die Embryonen wie Wildtyp Tiere. Unterschiede in der embryonalen Gefäßbildung, Organentwicklung oder Größe konnten nicht beobachtet werden. Im adulten Organismus wirkte sich die Lodavinexpression in 70% der Milzgefäße nicht auf die Organgröße aus, so dass letztendlich nur das Mikromilieu innerhalb des Tumorgewebes eine mögliche Erklärung für die Wachstumszunahme der experimentellen Tumoren bieten könnte.

Für eine klinische Anwendung scheint das gesteigerte Tumorwachstum zunächst ungünstig. Derzeit ist es noch nicht möglich, biotinylierte Therapeutika an experimentellen Tumoren auszutesten. Die Herstellung funktionaler biotinylierter Chemotherapeutika oder Radionuklide durch die Kooperationspartner Ark Therapeutics, London und der Arbeitsgruppe von Seppo Ylä-Herttuala, Kuopio, Finnland dauern an. Basierend auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin des Fusionsproteins zu Biotin des Liganden wäre es durchaus denkbar, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Modelle herkömmlichen Methoden, wie der „pretargeting“ Immuntherapie oder konventionellen

Chemotherapie, überlegen sind. Durch die außergewöhnlichen Bindungseigenschaften könnten die reaktiven Liganden effizienter im Zielgewebe akkumulieren, so dass eine Wachstumsinhibition der Tumoren signifikant schneller auftreten bzw. dosimetrische Analysen zur Verteilung von Radionukliden signifikant günstiger ausfallen würden als in Kontrollgruppen. Hierzu sollten *in vivo* Pharmakokinetiken biotinylierter Therapeutika oder Diagnostika mit nicht konjugierten verglichen werden. Zudem sollten Vergleiche zwischen Fusionsprotein-exprimierenden Tumoren und Kontrolltumoren erstellt werden. Das Austesten geeigneter Konjugate und deren Auswirkung auf das Tumorwachstum bleibt Aufgabe weiterer Studien.

Zusätzlich sollte für einen klinischen Ansatz aufgrund der signifikanten Zunahme des Tumorwachstums auf ein induzierbares System fokussiert werden. Dies minimiert die zeitliche Expression der Fusionsproteine und umgeht mögliche Interferenzen, wie sie durch Überexpression von Lodavin und Scavidin während der Tumorentwicklung auftraten. Darüber hinaus reflektiert die Expression eines für die Therapie oder Diagnostik einsetzbaren Gens nach der Entwicklung eines experimentellen Tumors im Tiermodell eher eine klinische Anwendung. Es liegen bereits einige *in vivo* Studien vor, die die Anwendung des Tetrazyklin-induzierbaren „tet-on Systems“ an transgenen Reportertieren demonstrierten (Fedorov et al., 2001; Gallagher et al., 2003; Schonig et al., 2002). Bei Etablierung des tumorzellspezifischen Modells ist dieser Ansatz bereits einbezogen worden und verweist auf verbundene Schwierigkeiten. Unter Zellkulturbedingungen wurde die induzierbare Expression der Fusionsproteine für die selektionierten BFS-1/Lodavin und BFS-1/Scavidin Klone bestätigt. Nur unter Zugabe von Doxyzyklin (Dox) ins Kulturmedium wurde die Expression aktiviert (Abb. III.1.15). *In vivo* zeigte sich, dass die regulierbare Expression durch Zugabe von Dox ins Trinkwassers nur in Tumoren zu beobachten war, die sich aus Zellen des BFS-1/Scavidin Klons entwickelten (Gruppe IV). Erhielten die Mäuse kein Dox (Gruppe III), so war die Expression abgeschaltet (Abb. III.1.17). Anders verhielt es sich bei der Expression von Lodavin in Tumoren des BFS-1/Lodavin Klons. Die Immunfluoreszenzfärbung an Tumorschnitten zeigte, dass Lodavin unabhängig von der Gabe des Induktors exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Solche Basalaktivität des tet-on Systems ist auch in transgenen Tiermodellen beschrieben worden (Zhu et al., 2002) und führte zur Generierung von Mutanten des reversen Tc-antwortenden Transaktivators rtTA oder zur Entwicklung von Suppressoren wie tTS („tetracycline-controlled transcriptional silencer“) (Freundlieb et al., 1999). Letzterer basiert auf der KRAB-AB Domäne des Kid-1 Proteins

aus *E.coli* und wirkt in Abwesenheit von Dox als zusätzlicher transkriptioneller Repressor, ohne dabei die Induktion der Transgenexpression unter Dox zu verändern. *In vivo* Studien an transgenen Mäusen demonstrierten, dass solche tTS-Systeme keine Hintergrundexpression des Transgens aufzeigten (Zhu et al., 2002).

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Etablierung eines induzierbaren Systems zur endothelzellspezifischen Expression von Lodavin und Scavidin begonnen. Diese basiert ebenfalls auf dem tet-System (Clontech, Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) und erfordert die Generierung zweier verschiedener transgener Mauslinien (siehe II.13.14). Die so genannte „Regulator-Linie“ exprimiert dabei endothelzellspezifisch den Transaktivator (rtTA oder tTA) unter der Kontrolle der murinen *flk-1p/e*. Die „Responder-Linie“ ist transgen für eines der Fusionsproteine Lodavin oder Scavidin unter der Kontrolle eines ubiquitär aktivierbaren Minimalpromotors, dem Tetrazyklin-respondierenden Elemente (TRE) vorgelagert sind. Verpaart man beide Linien, so induziert in doppel-transgenen Nachkommen die Bindung des endothelzellspezifisch exprimierten Transaktivators (rtTA oder tTA) an das TRE die Expression des Zielgens. Prinzipiell sind für *in vivo* Anwendungen rtTA-Systeme geeigneter, da eine Genexpression nur nach Gabe des Induktors induziert wird. Die Generierung des induzierbaren Systems zur endothelzellspezifischen Expression von Lodavin oder Scavidin im doppel-transgenen Tiermodell soll in zukünftigen Arbeiten weiter verfolgt werden.

Ein gefäßspezifisches induzierbares System wurde bereits publiziert (Teng et al., 2002). Hierbei regulierten Elemente des murinen *tie-2* Gens die endothelzellspezifische Expression des Transaktivators rtTA, der in doppel-transgenen Tieren wiederum die Expression des Reportergens *lacZ* induzierte. Nachteil dieses Systems als Modell für therapeutische Anwendung ist, dass die regulatorischen Elemente des *tie-2* Gens auch im adulten Endothel aktiv sind. So konnte unter Gabe von Dox die Reportergenexpression beginnend an Tag E9,5 der Embryonalentwicklung beobachtet werden, aber auch alle Gefäße des adulten Organismus zeigten eine Expression. Dem gegenüber sind die in dieser und vorherigen Arbeiten beschriebenen *flk-1p/e* für einen therapeutischen Ansatz von Vorteil, weil sie die Expression des Transaktivators nur im aktiven Endothel regulieren würden.

Speziell für gentherapeutische Ansätze wurden auch virale induzierbare Systeme etabliert. So konnte mittels Retroviren, Adenoviren oder rekombinanter Adeno-assoziierten Viren (rAAV) in Kombination mit Tetrazyklin-kontrollierenden Elementen

in vitro und *in vivo* eine zellspezifische und regulierbare Expression von heterologen Genen erzielt werden (Ghersa et al., 1998; Ho et al., 1996; Iida et al., 1996; Rendahl et al., 2002; Yoshida und Hamada, 1997). Auch wurden außer dem tet-System andere induzierbare Modelle beschrieben und an transgenen Tieren vorgestellt. Hierzu zählen das Ecdyson-regulierbare System (Saez et al., 1997; 2000), das Lac Operator-Repressor System (Cronin et al., 2001) sowie das induzierbare GAL4/RU486 System (Tsai et al., 1998). Die Etablierung eines geeigneten induzierbarer Systems für die zellspezifische Expression von Lodavin und Scavidin sollte Ziel weiterer Arbeiten sein.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Funktionalität des Lodavin/Scavidin-Systems zur Bindung und Akkumulierung eines systemisch verabreichten Liganden für therapeutische und/oder diagnostische Zwecke *in vivo* getestet werden. Hierzu sollten durch Ark Therapeutics, London, sowie der Arbeitsgruppe von Seppo Ylä-Herttuala am I.A. Virtanen Institut der Universität Kuopio, Finnland, biotinylierte Chemotherapeutika bzw. Radionuklide für die in dieser Arbeit etablierten Tiermodelle generieren werden. Da es derzeit weder den Kooperationspartnern möglich ist, ein funktionales biotinyliertes Agens herzustellen, noch biotinylierte Therapeutika oder Diagnostika kommerziell zu erhalten sind, fokussierten die Studien auf die systemische Verabreichung biotinylierter Modellliganden. Basierend auf der günstigeren zellbiologischen Charakteristik von Lodavin gegenüber Scavidin und dem hohen Expressionslevel im Endothel der Milz adulter Flk-1-Lodavin transgener Mäuse, wurden erste Bindungsstudien an diesen Tieren und ohne Tumortransplantate durchgeführt. Aufnahmen der Milz mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestätigten die Expression von Lodavin auf der Oberfläche der Endothelzellen (Abb. III.1.6 D). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die *flk-1p/e* vermittelte Expression von Lodavin (und Scavidin) in transfizierten Endothelzellen zur spezifischen Bindung des biotinylierten Liganden Fluorescein führte (Abb. III.1.2). Abzuklären blieb, ob *in vivo* endogenes Serumbiotin die extrazellulären Ligandenbindungsstellen von Lodavin blockiert oder Einfluss auf die Bindungseigenschaften des applizierten Liganden nimmt. Einige Studien an Tiermodellen wiesen darauf hin, dass endogenes Biotin mit Avidin- bzw. Streptavidin-basierenden Systemen interferieren kann (Rusckowski et al., 1997; Sharkey et al., 1997) und zur partiellen Blockierung der Biotinbindungsstellen von Streptavidin führte (Axworthy et al., 2000). So mussten Mäuse während eines Versuchs auf Biotin freie Kost gesetzt werden oder wurde vor Applikation des biotinylierten Liganden endogenes Biotin durch intraperitoneale Gabe von Streptavidin gebunden.

Zum Nachweis der Bindung am Milzendothel wurden adulten Flk-1-Lodavin transgenen Tieren verschiedene Verbindungen intravenös verabreicht und deren Verteilung im Körper zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert (siehe Tab. II.6). Durch Applikation des biotinylierten Kaninchen Immunglobulins (rb-IgG) konnte eine spezifische Akkumulierung im Gefäßsystem der Milz adulter Flk-1-Lodavin transgener Mäuse gezeigt werden (Abb. III.1.21 B). Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung bestätigte, dass der Ligand ausschließlich in Co-Lokalisation mit Lodavin detektiert werden konnte (Abb. III.1.21 C). In den anderen untersuchten Organen oder in der Milz von Wildtyp Tieren wurde eine unspezifische Bindung nur selten beobachtet. Eine Blockierung der Biotinbindungsstellen von Lodavin trat nicht auf. Dieses Ergebnis wurde 15 min nach Applikation des biotinylierten rb-IgG erzielt und konnte zu späteren Zeitpunkten (6 bzw. 24 h) nicht gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass nach längeren Zeiträumen der verabreichte rb-IgG bereits ausgeschieden oder nach der Endozytose abgebaut wurde. Mit dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die endothelzellspezifische Expression des Fusionsproteins Lodavin zu einer spezifischen Akkumulierung eines systemisch verabreichten Modellliganden im Zielgewebe führte. Darüber hinaus gelang es kürzlich den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Seppo Ylä-Herttuala diese Ergebnisse mittels Magnetresonanztomographie quantitativ zu bestätigen. Hierzu wurden Flk-1-Lodavin transgenen Tieren systemisch biotinylierte Eisenpartikel von ca. 50 nm Größe (bUSPIO) bzw. nicht-biotinylierte Partikel (USPIO) zur Negativkontrolle i.v. appliziert. Durch Bestimmung der T₂-Relaxationszeit, die als reziprokes Maß der Akkumulierung des metallischen Liganden innerhalb eines Organs berechnet werden kann, konnte eine ca. 10-fach gesteigerte Ansammlung von bUSPIO im Vergleich zu USPIO in der Milz transgener Tiere ermittelt werden (persönliche Mitteilung).

Lehtolainen et al. demonstrierten in einem Gliomamodell an Ratten, dass die intratumorale Injektion des biotinylierten Liganden HRP zu einer spezifischen Akkumulierung in Scavidin- bzw. Lodavin-exprimierenden Arealen des Tumors führte (Lehtolainen et al., 2002; 2003). Im endothelzellspezifischen Modell der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung dieses Liganden nach systemischer Verabreichung nicht bestätigt werden. Trotz der stärkeren Expression von Lodavin im hier vorgestellten transgenen Tiermodell verglichen zum Gliomamodell war es nicht möglich, bHRP endothelassoziert nachzuweisen. Gleiches traf auch für das systemisch verabreichte biotinylierte Fluorescein zu. Biotinylierte Fluorosphaeres mit einem Durchmesser von 1 bzw. 0,04 µm wurden vornehmlich im retikuloendothelialen System metabolisierender

Organe wie der Milz und Leber detektiert. Quantitative Unterschiede waren nicht ersichtlich, so dass diese Befunde nicht mit der Expression von Lodavin in Zusammenhang standen. Hepatische Kupfferzellen und Makrophagen der Milz könnten für die Akkumulierung der Liganden verantwortlich sein. Auch ist bekannt, dass Endothelien dieser Organe Poren mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm ausbilden und über eine fenestrierte Basalmembran verfügen, die die Transzytose der Fluorospheres aus dem Blutstrom in die Gewebe begünstigen. In Niere und Lunge wurden die Fluorospheres nur vereinzelt wieder gefunden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die unspezifische Akkumulierung der Fluorospheres in der Leber und Milz auf die chemische Zusammensetzung ihrer Oberfläche und ihre Größe zurückzuführen ist. Sie bestehen aus Polystyrol und sind weitestgehend hydrophob. Anders als bei der Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) oder Monosialgangliosid (GM) gekoppelter Polymere (Allen, 1994; Gabizon und Papahadjopoulos, 1992) sind die verwendeten Fluorospheres durch ihre Oberflächenstruktur und Ladung nicht inert, adsorbieren unspezifisch und werden phagozytiert. 4 μm große Fluorospheres wurden ausschließlich im Milzgefäßsystem detektiert. Auch in diesem Versuchsansatz konnte kein Zusammenhang mit der Expression von Lodavin und der organspezifischen Ansammlung bestätigt werden. Der Ligand wurde gleichermaßen in transgenen wie auch Wildtyp Tieren detektiert. Quantitative Unterschiede waren nicht ersichtlich. Eine mögliche Erklärung könnte die physiologische Funktion der Milz bei der Blutmauserung sein. Das Gefäßsystem der Milz ist spezialisiert auf das Abfangen und den Abbau alter Erythrozyten, die durch ihre rigide Struktur in diesem akkumulieren, aus dem Blut gefiltert und phagozytiert werden. Die Größe von 4 μm entspricht in etwa denen der Erythrozyten, was Grund für die Akkumulierung im Gefäßsystem der Milz sein könnte.

Derzeit ist die Generierung von Nanopartikel zum Transport von Proteinen, Peptiden, Medikamenten oder Genen für diagnostische oder therapeutische Anwendungen Gegenstand der Forschung (zusammengefasst in Panyam und Labhasetwar, 2003). Solche Studien fokussieren vornehmlich auf den Einfluss der Partikelgröße (Desai et al., 1997; Zauner et al., 2001) und deren Oberflächenbeschaffenheit (Jain et al., 2000; Moghimi et al., 2001) zur optimierten intrazellulären Aufnahme wie auch auf die verbesserte gewebe- oder zellspezifische Wirkstofffreisetzung am Zielort. So wurden bereits Nanopartikel entwickelt, die durch den Einbau eines $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten bzw. eines Anti-Flk-1-Antikörpers eine gezielte Akkumulierung im Endothel experimenteller Tumoren vermittelten (Hood et al., 2002; Li et al., 2004; Reynolds et al., 2003). Je nach Kopplung

des therapeutischen Agens dienten die Nanopartikel als Transportsystem des Radionuklids ^{90}Y oder dem Gentransfer einer dominant-negativen RAF Kinase. In beiden Fällen konnte durch die gezielte Akkumulierung am Tumorendothel eine Tumorregression beobachtet werden. Denkbar wäre, dass durch Substitution des Antikörpers gegen Biotin solche Nanopartikel als universelle Liganden für das Lodavin/Scavidin-System dienen könnten. Der wesentliche Vorteil wäre, dass die Bindung eines biotinylierten Nanopartikels an Avidin des Fusionsproteins um das 10^6 -fache stärker ist als die Interaktion zwischen dem Antikörper eines Nanopartikels und dem Epitop auf der Tumoroberfläche. Damit würde dieser effizienter am Tumorgewebe akkumulieren und zu einer Erhöhung der lokalen Wirkstofffreisetzung führen. Eine Reduktion unspezifischer Nebenwirkungen in anderen Geweben könnte erzielt werden. Zudem könnten dieselben Nanopartikel nach zellspezifischer Expression der Fusionsproteine Anwendung in anderen Geweben finden. Erst kürzlich wurde die Synthese biotinylierter Nanopartikel publiziert, die als Vehikel der Therapeutika „All-trans-Retinoic Acid“ (ATRA) bzw. Adriamycin (ADR) vorgestellt wurden (Kim und Kim, 2003; Na et al., 2003). *In vivo* könnten diese als Liganden im vorgestellten Lodavin/Scavidin-System auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden.

Trotz präklinischer und klinischer Anwendungen Avidin-Biotin-basierender Methoden, ist es derzeit nicht möglich, biotinylierte Verbindungen für diagnostische oder therapeutische Zwecke kommerziell zu erwerben. Dies verweist auf die Problematik bei der Generierung optimierter biotinylierter Transporter, die als Vehikel Radionuklide, Medikamente oder Gene für *in vivo* Anwendungen sicher zum Zielgewebe transportieren. Erste Studien mit den biotinylierten Chemotherapeutika Camptothecin oder Irinotecan an kultivierten Zellen zeigten, dass Lodavin-exprimierende Zellen denselben IC_{50} -Wert aufwiesen, wie Zellen, die das unbiotinylierte toxische Agens erhielten (persönliche Mitteilung von S. Ylä-Herttuala). Ein möglicher Grund könnte der lipophile Charakter der Chemotherapeutika sein, so dass der Durchtritt durch die Zellmembran durch die Lodavin-vermittelte Bindung nicht weiter verstärkt wird. Zudem stellt die Funktion der endogene Biotinidase ein wesentliches Problem dar, das mit dem System interferieren kann. Die Biotinidase ist ein ubiquitäres Enzym, das im Serum in mikromolaren und damit höheren Konzentrationen als Biotin vorliegt (Chauhan und Dakshinamurti, 1988). Es verfügt über zwei Bindungsstellen für Biotin mit einer Affinität von $K_d=3 \times 10^{-9}$ M und $K_d=6 \times 10^{-10}$ M (Hymes et al., 1997). Endogen katalysiert die Biotinidase die Spaltung der Biotinamidbindung innerhalb des Biocytins (Biotinyl- ϵ -Lysin), was zur Freisetzung von

Biotin und Lysin führt. Um zu verhindern, dass biotinylierte Verbindungen für therapeutische Zwecke der Hydrolyse durch die Biotinidase unterliegen, sollen Modifizierung der Biotinamidbindung diese resistent gegenüber dem Enzym machen. So konnten biotinylierte Konjugate durch Substitutionen am α -Kohlenstoffatom, Alkylierungen der Amidgruppe oder die Konjugation von Biotin über einen N-Methyl linker der Biotinidaseaktivität im Serum widerstehen (van Gog et al., 1998; Wilbur et al., 1997). Auch die Generierung neuer Biotinderivate mittels makrozyklischer Chelatoren wie DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraacetic Acid) eröffnen Möglichkeiten, um der Spaltung durch die Biotinidase zu entgehen. So zeigten neuste Studien eines biotinylierten DOTA-⁹⁰Y Konjugates viel versprechende Verbesserungen, die für Radioimmuntherapien von Vorteil wären (Sabatino et al., 2003).

Zusammenfassend wurden durch die Generierung Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgener Mäuse mit der vorliegenden Arbeit erstmals therapeutische Gene endothelzellspezifisch während der Neovaskularisierung experimenteller Tumoren exprimiert, deren Expression im übrigen Endothel weitestgehend abgeschaltet ist. Auch konnte erstmals histologisch gezeigt werden, dass der retrovirale Gentransfer im Co-Injektionsmodell von BFS-1 Fibrosarkomen mit GP+E86 Zellen ausschließlich in einer endothelzellspezifischen Expression des eingebrachten Gens, hier Lodavin, resultiert. *In vivo* Bindungsstudien bestätigen das Lodavin-System als neuartige und effiziente Methode zur zielgerichteten Akkumulierung eines systemisch verabreichten Liganden im Zielgewebe. Dennoch wird deutlich, dass trotz der hohen Bindungsaffinität von Biotin zu Avidin die spezifische Ansammlung des Liganden im Zielgewebe stark von dessen chemischer Zusammensetzung und Ladung abhängt. In Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern sollte die Generierung und das systematische Austesten geeigneter Konjugate sowie möglicher therapeutischer und/oder diagnostischer Verbindungen für das vorgestellte System Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein.

IV.2 Einfluss dominant-negativer Transkriptionsfaktoren auf die Tumorangiogenese

Bevor Tumoren eine Größe von wenigen Kubikmillimetern überschreiten können, ist die Bildung neuer Blutgefäße zur Versorgung des wachsenden Tumors nötig (Hanahan und Folkman, 1996). Im Wesentlichen umfasst dieser Prozess die Ablösung von Perizyten zur Destabilisierung benachbarter Gefäße, die Degradation der Basalmembran und der interstitiellen Matrix durch Proteasen, die Migration und Proliferation der Endothelzellen, die Ausbildung tubulärer Strukturen sowie die Stabilisierung der Gefäße durch die Anlagerung von Perizyten. Dabei ist das System aus VEGF und seiner Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1) essentiell. Dessen Beteiligung an der Neovaskularisierung von Tumorgewebe wurde in zahlreichen *in vivo* Hemmstudien bestätigt. So wurde die Überexpression löslicher VEGFR-2 Fragmente (Kou et al., 2004; Lin et al., 1998; Tseng et al., 2002) oder Mutanten der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die zur Bindung des Liganden, nicht aber zur intrazellulären Signaltransduktion fähig sind (Heidenreich et al., 2004; Machein et al., 1999; Millauer et al., 1996), als anti-angiogene Modelle beschrieben. Niedermolekulare Verbindungen, die selektiv die Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Flk-1 inhibierten, führten zur Hemmung des Wachstums experimenteller Tumoren (Ciardiello et al., 2004; Mendel et al., 2000; Ruggeri et al., 2003; Sun et al., 2004). Die spezifische Degradation der mRNA von VEGF-Rezeptoren durch synthetische Ribozyme (Pavco et al., 2000) oder von VEGF durch siRNA resultierte im Tiermodell in gehemmten Wachstum solider Tumoren und deren Metastasierung (Takei et al., 2004). Darüber hinaus führte die Applikation neutralisierender monoklonaler anti-VEGF Antikörper (Asano et al., 1995; Borgstrom et al., 1998; Kim et al., 1993; Warren et al., 1995) oder anti-Flk-1 Antikörper, die eine Blockierung der Rezeptorbindungsstellen bewirkten (Sweeney et al., 2002; Zhang et al., 2002), zu einer signifikanten Hemmung der Tumorangiogenese. Zu beachten ist jedoch, dass diese Studien alle an schnell wachsenden experimentellen Tumormodellen durchgeführt wurden, die über einen hohen endothelialen Proliferationsindex verfügen, der mit dem endogener Tumoren von Patienten nicht zu vergleichen ist (zusammengefasst bei Denekamp, 1993). Der angiogene Status und die Heterogenität der Gefäßreifung eines Tumors *in situ*, sowie einer Tumorart bei verschiedenen Patienten bzw. verschiedener Tumortypen variiert erheblich und nimmt damit maßgeblich Einfluss auf den klinischen Erfolg einer anti-angiogenen Therapie (Eberhard et al., 2000). Zahlreiche der am Tiermodell analysierten anti-angiogenen Therapieansätze werden derzeit in klinischen

Studien getestet (zusammengefasst bei Ferrara et al., 2004). Erst kürzlich wurde die weltweit erste Phase-III-Studie bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen mit dem rekombinanten und humanisierten, monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin, Genentech) präsentiert, die das Behandlungskonzept der Anti-Angiogenese in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie bestätigte (Hurwitz et al., 2004). Die signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Patienten war darauf zurückzuführen, dass die Behandlung mit Bevacizumab u.a. zu einer Abnahme der Perfusion, des vaskulären Volumens und der mikrovaskulären Kapillardichte innerhalb des Tumors führte, wodurch ein verminderter interstitieller Tumordruck den Zugang der Chemotherapeutika in das tumorale Gewebe erleichterte (Willett et al., 2004). Mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. ZD6474 (Astra Zeneca), einem oralen Inhibitor der Tyrosinkinase von VEGF Rezeptoren und des EGF-Rezeptors, interferieren diese therapeutischen Ansätze generell mit einer Komponente des Systems (VEGF oder VEGFR), das die Tumorangio-genese kontrolliert. Die Blockierung der transkriptionellen Regulation angiogeneserelevanter Gene könnte eine viel versprechende Alternative zur Hemmung der Gefäßneubildung von Tumoren sein. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden wäre, dass die Blockierung eines Signalwegs durch Hemmung eines endothelialen Transkriptionsfaktors Auswirkung auf die Expression mehrerer Zielgene nehmen kann.

Einige der aus der großen Familie der Ets-Faktoren stammenden Mitglieder wie Ets-1, aber auch Fli-1, Erg, TEL1 und NERF-2 („new Ets-related factor-2“) werden in Endothelzellen und deren Vorläufern exprimiert (Pardanaud und Dieterlen-Lievre, 1993; Sato, 2001; Vandenbunder et al., 1989). Dabei ist die transiente Expression von Ets-1 streng mit der Aktivierung von Endothelzellen assoziiert, womit dieser Transkriptionsfaktor ein mögliches Kandidatenglied zur Hemmung endothelialer Signalwege darstellt. Die von Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF oder TNF α stimulieren parakrin die Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 in angrenzenden Endothelzellen und vaskulären Muskelzellen. Ets-1 wiederum aktiviert die Expression von Zielgenen, die einen angiogenen und invasiven Phänotyp hervorrufen, womit Ets-1 maßgeblich an der transkriptionellen Regulation der Endothelzelle während der Neovaskularisierung beteiligt ist. Auch das Mikromilieu innerhalb eines Tumors könnte die Expression von Ets-1 regulieren. Als kompensatorische Antwort auf einen lokalen Sauerstoffmangel innerhalb des schnell proliferierenden Tumorgewebes nimmt die Stabilisierung Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIF) zu. Reporter-genstudien zeigten,

dass HIF1 einen direkten stimulatorischen Einfluss auf die Aktivität des *ets-1* Promotors besitzt (Oikawa et al., 2001). Kultivierte bovine Endothelzellen der Retina zeigten eine Hypoxie-induzierte Ets-1 Expression auf mRNA Ebene, die sich jedoch durch neutralisierende anti-VEGF Antikörper unterdrücken ließ (Watanabe et al., 2004). Dies spricht dafür, dass die Expression von VEGF die Primärantwort auf das hypoxische Umfeld ist, die sekundär zur Stimulierung der Ets-1 Expression führt.

Zahlreiche Studien bestätigen die Abhängigkeit des angiogenen Phänotyps der Endothelzellen von Ets-1. So zeigten DNA-Microarray Analysen, dass die adenovirale Überexpression von Ets-1 in HUVECs zu einer Induktion 22 verschiedener angiogeneserelevanter Gene führte, von denen sieben mehr als 2,5-fach erhöht waren (Teruyama et al., 2001). In Endothelzellen stimuliert Ets-1 die Expression matrixdegradierender Proteinasen wie uPA (Iwasaka et al., 1996) oder MMP-1, MMP-3 und MMP-9 (Sato, 1998), die für die Degradation der Basalmembran nötig sind. Ebenso konnte eine Ets-1 vermittelte Expression von β 3-Integrin gezeigt werden, einer Untereinheit der endothelialen Integrin-Rezeptorfamilie, die fördernd auf die Migration von Endothelzellen wirken (Oda et al., 1999). Auch der Einfluss von Ets-1 auf die Expression von VE-Cadherin, einem Kalzium-abhängigen endothelzellspezifischen Adhäsionsmolekül, das u.a. für die Ausbildung tubulärer Strukturen verantwortlich ist, wurde demonstriert (Lelievre et al., 2000; Vittet et al., 1997). Für die Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 (Iljin et al., 1999) und Tie-2 (Schlaeger et al., 1997), die essentiell für die Remodellierung bestehender Gefäße sind, konnte eine Abhängigkeit von Ets-1 Bindungsstellen demonstriert werden. Außerdem wurde erst kürzlich die Aktivierung des humanen Ang-2 Promotors durch Ets-1 (Hasegawa et al., 2004; Hegen et al., 2004) publiziert. Reporteragen Analysen zeigten, dass Ets-1 stimulierend auf die Promotoren der VEGF-Rezeptoren Flt-1 (Morishita et al., 1995; Wakiya et al., 1996) und Flk-1 (Elvert et al., 2003; Kappel et al., 1999; Kappel et al., 2000) wirkt, die als die wesentlichen Rezeptoren der VEGF-vermittelten Tumorangiogenese betrachtet werden.

In vivo Daten stützen die Ets-1-abhängige Regulation endothelialer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. So konnte eine Korrelation der endothelzellspezifischen Genexpression zwischen *ets-1* und *flt-1* während des Wachstums humaner Astrozytome bestätigt werden (Valter et al., 1999). Mutationsanalysen des murinen *flk-1* Promotors zeigten, dass eine der zwei funktionalen Ets-Bindungsstellen (EBS) für die Stärke der endothelzellspezifischen Reporterexpression im transgenen Mäuseembryo essentiell ist (Kappel et al., 1999). Im *flk-1* Enhancer sind neben Bindungsstellen für Ets-1 auch

solche für Mitglieder der SCL/Tal-1- bzw. GATA-Familie entscheidend (Kappel et al., 2000). All diese Untersuchungen belegen, dass Ets-1 aufgrund seines positiven Einflusses auf die Expression zahlreicher endothelzellspezifischer Moleküle von entscheidender Bedeutung für angiogene und invasive Prozesse ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Auswirkung die Blockierung Ets-1-vermittelter Signalwege auf die Tumorangio-genese nimmt. Hierzu sollte eine dominant-negative Ets-1 Mutante (dnEts-1) aus den Aminosäuren 306-423 (Mattot et al., 2000) während des Tumorstwachstums überexprimiert werden und als mögliches anti-angiogenes Modell für die Therapie untersucht werden.

Die verwendete Deletionsmutante dnEts-1 bestand aus der DNA-Bindungsdomäne (DBD oder ETS) und der Kernlokalisationssequenz, während die Transaktivierungsdomäne (TAD) und die α -helikale Domäne (PNT) für die Interaktion mit anderen Proteinen deletiert waren. Auch die größten Teile des Autoinhibitionsmoduls (ID) waren entfernt (Abb. III.2.1 A). *In vitro* wurde bestätigt, dass diese Mutante Ets-1-abhängige Signalwege inhibieren kann. Dazu wurde der 939 bp große *flk-1* Promotor verwendet, der über zwei funktionale EBS verfügt und die Expression des Luziferase Reportergens *in vitro* reguliert (Kappel et al., 2000). Die basale *flk-1* Promotoraktivität wurde durch Expression der Deletionsmutante dnEts-1 in HUE und A293 Zellen leicht herabgesetzt. Die Ets-1-vermittelte Aktivierung des *flk-1* Promotors wurde signifikant gehemmt (Abb. III.2.1 C und D). In keiner der verwendeten Zelllinien konnte eine vollständige Reduzierung der Promotoraktivität auf basales Level erreicht werden. Eine mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen Expressionsstärken der Transkriptionsfaktoren sein. Die Expression von Ets-1 wurde durch den CMV Promotor, die von dnEts-1 dagegen durch die retrovirale 5'LTR reguliert. Dennoch zeigten diese *in vitro* Daten, dass die Deletionsmutante einen dominant-negativen Einfluss auf den Ets-1 Wildtyp ausübt.

Die dominant-negative Wirkung der Deletionsmutante basiert nicht nur auf der Deletion der Transaktivierungsdomäne, sondern ist auch auf die Affinität zur Bindung an die DNA zurückzuführen. Die Affinität von Ets-1 wird durch die inhibitorischen α -Helices HI1 und HI2 des aminoterminalen sowie HI3 des carboxyterminalen Inhibitionsmoduls moduliert. Im inhibierten Zustand interagieren HI1, HI2 und HI3 mit der α -Helix H1 der ETS-Domäne und bewirken eine Konformationsänderung der DNA-Bindungsdomäne (Donaldson et al., 1996; Skalicky et al., 1996). Dies wird zusätzlich durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung von vier Serinresten innerhalb der N-terminalen ID verstärkt (Cowley und Graves, 2000; Rabault und Ghysdael, 1994). DnEts-1 konkurriert mit dem

Ets-1 Wildtyp um die Bindung an die EBS. Durch Deletion der größten Teile der ID verfügt die Mutante jedoch über eine höhere Affinität und bewirkt somit eine Blockierung des *flk-1* Promotors ohne Transaktivierung desselben. Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen einer erst kürzlich charakterisierten murinen Spleißvariante des Ets-1 Proteins. Das so genannte p42Ets-1 ist um die 261 bp des aminoterminalen Autoinhibitionmoduls verkürzt und ähnelt damit dnEts-1. Im Vergleich zu Ets-1 zeigte p42Ets-1 im EMSA-Test eine höhere Affinität zur EBS des VE-Cadherin Promotors (Lionneton et al., 2003). Die nukleäre Lokalisation von dnEts-1 wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. III.2.1 B). Auch andere Ets-1 Mutanten, denen N-terminale und/oder C-terminale Bereiche relativ zur ETS-Domäne fehlten, wiesen eine höhere Bindungsaffinität zur DNA auf (Hagman und Grosschedl, 1992; Hahn und Wasylyk, 1994; Lim et al., 1992; Nakano et al., 2000). Zudem wurde die dominant-negative Wirkung einer Ets-1 Mutante durch Protein-Protein Interaktion postuliert, die unabhängig von der Bindung an die DNA resultierte (Sieweke et al., 1998).

Um zu untersuchen, ob die Blockierung Ets-1-abhängiger Signalwege einen negativen Einfluss auf die pathophysiologische Angiogenese *in vivo* nehmen kann, wurde die Deletionsmutante endothelzellspezifisch überexprimiert. Hierzu wurde das Modell der subkutanen Co-Injektion von Tumorzellen mit virusproduzierenden GP+E86 Zellen verwendet (Abb. III.1.12). Wie in dieser Arbeit erstmals histologisch gezeigt werden konnte, infizieren in diesem Modell die Retroviren selektiv einsprossende Zellen des Gefäßsystems, nicht aber co-injizierte BFS-1 Fibrosarkoma Zellen. Vorangegangene Arbeiten demonstrierten, dass es sich bei BFS-1 Fibrosarkomen um stark vaskularisierte Tumoren handelt. Eine Abhängigkeit der Tumورprogression vom VEGF/VEGFR-2-System konnte bestätigt werden (Heidenreich et al., 2004). So resultierte der retrovirale Gentransfer von VEGFR-Mutanten, die zur Bindung des Liganden VEGF, nicht aber zur Signaltransduktion fähig waren, in einer signifikanten Inhibition des Tumорwachstums durch Hemmung der Tumорangiogenese. Diese Ergebnisse führten zu der Arbeitshypothese, dass der Einfluss von dnEts-1 auf die transkriptionelle Regulation von *flk-1* zu einer Hemmung der Expression führen könnte, die sich negativ auf die Tumорangiogenese auswirkt. Gleichzeitig könnten weitere für die Tumорangiogenese essentielle Ets-1-abhängige Signalwege, wie die Expression matrixdegradierender Enzyme oder Adhäsionsmoleküle, blockiert werden.

Die Analysen der Fibrosarkome zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach subkutaner Co-Injektion zeigten, dass die retrovirale Überexpression der Deletionsmutante tatsächlich zu

einer leichten Abnahme der Flk-1 Expression führte (Abb. III.2.4 A). Das Tumorstadium wurde jedoch nicht beeinflusst. So waren die Größe und das Gewicht mit Kontrolltumoren vergleichbar (Abb. III.2.5 A/B). Makroskopisch konnten keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch die histologischen Untersuchungen unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen PECAM-1 und Flk-1 bestätigten keine Veränderungen der Gefäßdichte oder vaskulären Morphologie (Abb. III.2.5 C). Eine verminderte Anzahl an Gefäßen durch Hemmung der Flk-1 Expression oder anderer angiogeneserelevanter Gene und eine dadurch vermittelte Inhibition der Tumoriangiogenese konnte histologisch nicht bestätigt werden. Unabhängig von der Expression der Deletionsmutante, die mittels RT-PCR Analyse bestätigt wurde (Abb. III.2.4 A), traten unterschiedlich stark vaskularisierte Bereiche in den Tumoren auf. Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis auf den verwendeten Tumortyp zurückzuführen war, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von dnEts-1 an einem zweiten experimentellen Tumormodell getestet. Hierzu wurden B16 Melanoma Zellen mit virusproduzierenden GP+E86 Zellen syngenen Mäusen subkutan co-transplantiert. Die Analysen der Tumoren zeigten, dass die Überexpression der Deletionsmutante zu einer starken Reduktion der Flk-1 Expression im Tumorgewebe führte (Abb. III.2.6). Auch die Expression anderer endothelialer Moleküle, wie NRP-1 oder VE-Cadherin, war vermindert (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurde auch in den Melanomen kein Einfluss der Deletionsmutante auf das Tumorstadium beobachtet (Abb. III.2.7). So wiesen dnEts-1-überexprimierende Tumoren ein mit Kontrolltumoren vergleichbares Wachstum auf. Größe, Gewicht und Volumen waren unverändert (Abb. III.2.7 A). Im Vergleich mit Kontrolltumoren konnten histologisch keine Veränderungen in der Vaskularisierung der dnEts-1-überexprimierenden Melanome beobachtet werden (Abb. III.2.7 B).

Diese Ergebnisse bestätigten nicht die Arbeitshypothese, dass die Hemmung von Ets-1 Signalwegen zur Inhibition der pathophysiologischen Tumoriangiogenese bzw. des Tumorstadiums führt. Generell scheint jedoch der Effekt von dnEts-1 stark vom Mikromilieu der Endothelzelle abhängig zu sein, da vorangegangene Arbeiten mit derselben oder einer ähnlichen Deletionsmutante die Inhibition der *in vitro* und der physiologischen *in vivo* Angiogenese demonstrierten. So resultierte die retrovirale Expression der Deletionsmutante in morphologischen Veränderungen muriner Endothelzellen aus Hirnkapillaren oder Aorten. Dies äußerte sich in einer verstärkten Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten und ging in Abhängigkeit des Zelltyps mit einer gesteigerten Fähigkeit zur Sprossung im Matrigel (Mattot et al., 2000) bzw. einer

gehemmten Expression von VE-Cadherin einher (Lelievre et al., 2000). Proliferation und Migration wurden nicht beeinflusst. Die adenovirale Überexpression einer ähnlichen Mutante (TMEts-1, codierend für die Aminosäuren 322-440) in Zellen der Linie MSS31, isoliert aus der Milz neugeborener Mäuse (Nakano et al., 2000), sowie bovinen Endothelzellen der Retina (Watanabe et al., 2004) führte hingegen zu einer Reduzierung der Proliferation, Migration und Invasion sowie zu einer verminderten Fähigkeit zur Tubulogenese. Diese differenten Ergebnisse der *in vitro* Studien weisen darauf hin, dass bereits Unterschiede der Expressionsregulation und der damit einhergehenden Expressionsstärke zu verschiedenen phänotypischen Veränderungen kultivierter Endothelzellen führen. Zudem wurden für die Untersuchungen unterschiedliche Zelllinien verwendet. *In vivo* Modelle bestätigten jedoch den inhibitorischen Effekt beider Ets-1 Mutanten auf die physiologische Angiogenese. So führte die retrovirale Überexpression der dnEts-1 zur Hemmung der FGF-induzierten Angiogenese im Ohr-Implantat-Modell (Pourtier-Manzanedo et al., 2003). Die Überexpression von TMEts-1 im subkutanen Matrigel-Test resultierte in einer signifikanten Inhibition der Gefäßbildung (Nakano et al., 2000) bzw. in der Hemmung der Neovaskularisierung im Modell der proliferativen Retinopathie (ROP) an Mäusen (Watanabe et al., 2004). Die durch Überexpression dominant-negativer Ets-1 Proteine erzielten Daten sind konsistent mit Ergebnissen aus antisense Studien. Die Hemmung der Ets-1 Expression durch *ets-1* antisense Oligodesoxynukleotide (ODN) wurde an kultivierten HUVECs und BAECs gezeigt. Die endogen induzierte Migration und Proliferation der Endothelzellen konnte blockiert werden und war auf eine inhibierte Expression der Ets-1 Zielgene uPA und MMP-1 zurückzuführen (Iwasaka et al., 1996; Yasuda et al., 1999). *In vivo* führte die Gabe von antisense ODN zu einer verminderten Ausbildung neuer Blutgefäße mit verkleinerten Lumen im Angiogenesemodell des Chorio-Allantois-Membran Tests (Wernert et al., 1999) und konnte eine Hemmung der HGF-induzierten Angiogenese im ischämischen Rattenmodell erzielt werden (Tomita et al., 2003). Im Hühnerembryo resultierte die i.v. Injektion von Retroviren codierend für antisense *ets-1* und *ets-2* u.a. in einer gestörten Entwicklung der Koronargefäße (Lie-Venema et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte sein, dass das Mikromilieu des Tumors sich von dem anderer *in vivo* Angiogenese-Modelle, wie dem Matrigel- oder CAM-Tests, unterscheidet. All diese Studien basieren auf Hemmung der physiologischen Angiogenese. Keine dieser Publikationen fokussierte auf die Blockierung von Ets-1 Signalwegen bei der Vaskularisierung malignen Tumorgewebes. Lediglich

Pourtier-Manzanedo et al. zeigten, dass sich aus transplantierten retrovirusproduzierenden GP+E86 Zellen, codierend für dnEts-1, Tumoren entwickelten, die im Vergleich mit Kontrolltumoren eine Reduktion der Gefäßdichte mit einer veränderten Morphologie aufwiesen. Das Tumorwachstum wurde nicht beeinflusst (Pourtier-Manzanedo et al. 2003). Dennoch ist dieses System fraglich. GP+E86 Zellen sind keine Tumorzellen sondern modifizierte NIH 3T3 Fibroblasten, die durch Integration retroviraler Gene die Fähigkeit erhalten haben, replikationsdefiziente Retroviren zu produzieren. Die von Pourtier-Manzanedo et al. beschriebene Reduktion der Gefäßdichte wurde nicht quantifiziert und in einen statistisch Zusammenhang zu Gefäßen von Kontrolltumoren gebracht.

Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben einer dnEts-1-vermittelten Inhibition der Tumorangiogenese könnte die Redundanz einzelner Ets-Faktoren sein. So demonstrierten zwei unabhängige Studien an *ets-1* „knock-out“ Mäusen, dass Ets-1 trotz prädominanter Expression in Endothelzellen und Beteiligung an der transkriptionellen Regulation angiogener Prozesse während der Embryonalentwicklung für die Vaskulogenese nicht essentiell ist (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). Die endothelzellspezifische Co-Expression anderer Ets-Familienmitglieder wie Erg oder Fli-1 sprechen für eine funktionale Redundanz dieser Transkriptionsfaktoren während der Gefäßbildung im Embryo (Lelievre et al., 2001; Maroulakou und Bowe, 2000), die auch während der Tumorangiogenese vorliegen und für das Ausbleiben eines anti-angiogenen Effekts sprechen könnten. Dagegen spricht, dass einige der Ets-Faktoren an ähnliche DNA-Sequenzen mit dem GGAA/T Kernmotiv der EBS binden. Damit ist nicht auszuschließen, dass dnEts-1 die Bindung und damit Funktion verschiedener Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilie inhibiert. Dies wurde in der vorliegenden und vorherigen Arbeiten jedoch nicht analysiert.

Neben Endothelzellen exprimieren auch stromale Fibroblasten invasiver Tumoren, inflammatorische Zellen oder Tumorzellen Ets-1 und andere Ets-Faktoren. So sind zahlreiche murine und humane Tumoren wie maligne Melanome (Rothhammer et al., 2004), Lungen- (Bolon et al., 1995), Mamma- (Behrens et al., 2001b) und Ovarialkarzinome (Behrens et al., 2001a; Khatun et al., 2003) beschrieben worden, die mit einer Aktivierung der Ets-1 Expression einhergehen. Generell korreliert hierbei das Expressionslevel mit dem Grad der Metastasierung oder des invasiven Charakters der malignen Erkrankung und wird als prognostischer Faktor diskutiert (Adam et al., 2003; Davidson et al., 2001; Khatun et al., 2003). In diesem Zusammenhang transaktiviert Ets-1

die Expression matrixdegradierender Enzyme, die die perizelluläre Proteolyse stromaler Strukturen bewirken. So konnte die Co-Expression einiger dieser Enzyme mit Ets-1 in Fibroblasten des Tumorstromas und in Abhängigkeit des Tumortyps auch in Tumorzellen selbst bestätigt werden (Behrens et al., 2003; Bolon et al., 1995; Davidson et al., 2001). In beiden experimentellen Tumormodellen der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression von endogenem Ets-1 auf mRNA Ebene nachgewiesen (Abb. III. 2.4 A und Abb. III.2.6). Die Überexpression der Deletionsmutante, selbst durch vierfachen Überschuss der retrovirusproduzierenden Zellen, führte jedoch in keinem der Systeme zu einem veränderten Tumorwachstum. Dementsprechend könnte aufgrund eines sehr hohen endogenen Ets-1 Gehalts im Tumorgewebe die durch den retroviralen Gentransfer erzielte Überexpression der Deletionsmutante für einen dominant-negativen Einfluss unzureichend sein.

Die Daten dieser Arbeit demonstrieren, dass trotz der wichtigen Funktion von Ets-1 bei angiogenen Prozessen der Endothelzellen eine alleinige Blockierung der Ets-1 Signalwege nicht ausreicht, um die pathophysiologische Gefäßbildung bzw. die Tumorprogression zu beeinflussen. Nicht zuletzt ist Ets-1 jedoch nur ein Faktor aus einem Komplex von Transkriptionsfaktoren, der die Expression angiogeneserelevanter Gene, wie *flk-1*, reguliert. Denkbar wäre, dass die Reduktion der Flk-1 Expression durch alleinige Blockierung eines Transkriptionsfaktors nicht ausreicht, um Flk-1 unter einen kritischen Schwellenwert zu regulieren, der für einen anti-angiogenen Effekt ausreicht. So zeigten *in vitro* und *in vivo* Studien eine Abhängigkeit der Flk-1 Expression von Transkriptionsfaktoren der HIF-, SCL/Tal-, GATA- und HoxB5-Familien, die ebenso endothelial vorliegen (Dorfman et al., 1992; Ema et al., 1997; Kallianpur et al., 1994; Kappel et al., 1999; 2000; Tian et al., 1997; Wu et al., 2003).

Dabei stellt speziell HIF2 ein wichtiges Kandidatengen dar, um mit der transkriptionellen Regulation in Endothelzellen zu interferieren. Für die Entwicklung und das Wachstum solider Tumoren spielt der intratumorale Sauerstoffgehalt eine entscheidende Rolle. Übersteigt das Tumorwachstum die maximale O₂-Diffusionsstrecke von 100-200 µm aus angrenzenden Blutgefäßen, treten innerhalb des Tumors lokale hypoxische Regionen auf. HIFs sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, deren α -Untereinheiten unter Normoxie für den proteasomalen Abbau markiert und rasch abgebaut werden. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen akkumulieren sie, translozieren in den Zellkern und binden als $\alpha\beta$ -Heterodimere mit dem konstitutiv exprimierten ARNT (HIF1 β) an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) ihrer Zielgene. Da HIF2 im Gegensatz zu HIF1 prädominant

endothelzellspezifisch exprimiert wird (Ema et al., 1998; Flamme et al., 1997, Tian et al., 1997), gilt er als essentieller intrinsischer Vermittler der Hypoxieantwort in Endothelzellen. Neuste *in vivo* Studien zeigten, dass die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen *flt-1*, *flk-1* und *tie-2* Zielgene von HIF2 α sind. So resultierte die adenovirale Überexpression von HIF2 α im murinen Wundheilungsmodell in einer Induktion der Expression dieser Rezeptoren (Takeda et al., 2004). Umgekehrt führte die Blockierung von HIF-Signalwegen durch endothelzellspezifische Überexpression einer HIF2 α Deletionsmutante (dnHIF2 α) während der Embryonalentwicklung zu einer letalen Störung der physiologischen Angiogenese und Herzentwicklung. Dies war zurückzuführen auf eine vollständige Hemmung der Expression von Flt-1 und Tie-2, sowie auf einer fünfzig prozentigen Reduktion der Flk-1 Expression. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die HIF-vermittelte Regulation endothelialer Rezeptoren für angiogene Faktoren effizient in kompensatorisches Gefäßwachstum umgesetzt wird, was auch Relevanz für pathophysiologische Fragestellungen bei der Tumorprogression haben könnte. Zudem weisen diese Daten darauf hin, dass für eine vollständige Hemmung der Flk-1 Expression, die Blockierung mehrerer Signalwege nötig ist. Reporter-genstudien und Mutationsanalysen stützen diese Hypothese. Der stimulatorische Effekt von HIF2 α nicht aber von HIF1 α auf die Promotoraktivität des *flk-1* Gens konnte bestätigt werden (Kappel et al., 1999). Dabei erfolgte die Bindung von HIF2 α an ein HRE-ähnliches Motiv (HBS) in direkter Nachbarschaft einer Ets-Bindungsstelle, die somit zusammen ein positiv-regulatorisches Element bilden (HBS/EBS). Durch Interaktion von HIF2 α mit Ets-1 wirkten diese synergistisch und führten zu einer mehr als additiven Co-Aktivierung der *flk-1* regulierten Reporter-genexpression *in vitro*. *In vivo* resultierte die Deletion einer der Bindungselemente in einer moderaten Abschwächung der Reporter-genexpression, während die Mutation beider HBE/EBS Elemente zu einer vollständigen Inhibition der endothelzellspezifischen LacZ Expression im transgenen Embryo führte (Elvert et al., 2003).

Diese Daten sprechen dafür, in zukünftigen Arbeiten HIF-Signalwege endothelzellspezifisch im Gefäßsystem experimenteller Tumoren zu blockieren, um die Auswirkung auf die pathophysiologische Angiogenese zu analysieren. Analog zur retroviralen Überexpression von dnEts-1 soll das endothelzellspezifische System der Co-Injektion experimenteller Fibrosarkome und Melanome angewandt werden. Die endogene Expression des HIF2 Wildtyp Transkriptionsfaktors wurde bereits in beiden Tumortypen nachgewiesen (Abb. III.2.9). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die HIF2 α

Deletionsmutante (dnHIF2 α) zur Generierung der Viren in einen retroviralen Vektor kloniert. Innerhalb der Mutante sind die beiden Transaktivierungsdomänen TAD C und TAD N, die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODD) sowie Teile der DNA-Bindungsdomäne (bHLH) deletiert (Abb. III.2.8 A; Elvert et al., 2003). Damit codiert dnHIF2 α für die Aminosäuren 24-325 des Wildtyp Transkriptionsfaktors. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Mutante HIF-abhängige Signalwege inhibieren kann. Hierzu wurde der 939 bp große *flk-1* Promotor verwendet, der über zwei funktionale HBS verfügt und die Expression des Luziferase Reportergens steuert (Elvert et al., 2003; Kappel et al., 2000). Die basale *flk-1* Promotoraktivität wurde durch dnHIF2 α Expression in HUE und A293 Zellen herabgesetzt. Die HIF2-vermittelte Aktivierung des *flk-1* Promotors wurde in Abhängigkeit der dnHIF2 Konzentration signifikant gehemmt (Abb. III.2.8 C und D). Diese *in vitro* Experimente lassen den Schluss zu, dass die Mutante einen dominant-negativen Effekt auf Wildtyp HIFs ausübt.

Ein möglicher Mechanismus, wie dnHIF2 die Hypoxie-Signalwege inhibiert, ist die Bindung der HIF1 β Untereinheit. Durch die verbleibenden PAS A und B Domänen vermag dnHIF2 α mit der HIF1 β Untereinheit zu dimerisieren und an die HRE zu binden. Damit ist die Transaktivierung der Zielgene blockiert und HIF1 β steht für andere α -Untereinheiten im Zellkern nicht mehr zur Verfügung. Die nukleäre Lokalisation von dnHIF2 α wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. III.2.8 B). Erst kürzlich wurde ein endogener negativer Regulator der Hypoxie-induzierbaren Genexpression gefunden (Makino et al., 2002). Dieser als IPAS (inhibitorisches PAS-Domänen Protein) bezeichnete Faktor ist eine Spleißvariante der HIF3 α Untereinheit. Er besitzt starke Homologie zu den bHLH PAS Domänen von HIF1 α und HIF2 α , verfügt aber über keine Transaktivierungsdomäne. Damit ähnelt er in seiner Proteinstruktur sehr der hier verwendeten Deletionsmutante. Endogen konnte IPAS in Purkinje Zellen und im Epithel der Cornea lokalisiert werden. Durch Bildung nicht funktionsfähiger Komplexe mit HIFs scheint er für den avaskulären Phänotyp dieser Gewebe verantwortlich zu sein. *In vitro* zeigte die Expressionen von IPAS einen dominant-negativen Effekt auf die HIF1 α - und HIF2 α -vermittelte Reportergenexpression. IPAS-exprimierende Hepatome wiesen in immundefizienten SCID Mäusen ein inhibiertes Wachstum mit reduzierter Gefäßdichte in Vergleich zu Kontrolltumoren auf (Makino et al., 2001). Diese Daten lassen vermuten, dass dnHIF2 α als Inhibitor der Vaskularisierung experimenteller Tumoren dienen kann, was in zukünftigen Arbeiten untersucht werden soll. Publizierten Daten zur Blockierung HIF2-abhängiger Signalwege während der Tumorprogression liegen derzeit nicht vor.

Lediglich eine *in vivo* Studie demonstrierte eine HIF2-Abhängigkeit des pathologischen Gefäßwachstums im Modell der Retinopathie (ROP) an Mäusen (Morita et al., 2003). Die physiologische Gefäßbildung der Retina von „knock-down“ Mäusen (HLF^{kd/kd}), die 20-80% weniger HIF2 exprimierten, verlief normal. Im ROP-Modell hingegen zeigten diese Mäuse verglichen mit Wildtyp Tieren keine proliferative Vaskularisierung der Retina. Unerwartet blieb die Expression von VEGF, Flt-1, Flk-1 und Tie-2 unverändert. Lediglich die Expression von Erythropoietin (Epo) war erniedrigt und verweist auf die Schlüsselfunktion dieses Faktors im angewandten Modell.

Die endotheliale Blockierung HIF2-abhängiger Signalwege durch die retrovirale Überexpression der dnHIF2 α Mutante stellt eine zusätzliche Möglichkeit dar, weitere Erkenntnisse zur spezifischen Rolle von HIFs bei der pathophysiologischen Gefäßneubildung, speziell bei der Neovaskularisierung von Tumorgewebe, zu gewinnen. Dies als mögliches anti-angiogenes Modell, auch in Co-Expression mit dnEts-1, für die Therapie maligner Erkrankungen zu untersuchen, sollte Aufgabe zukünftiger Studien sein.

V. Zusammenfassung

Lodavin und Scavidin (Lehtolainen et al., 2002; 2003) sind membranständige Fusionsproteine, die aus Anteilen eines endozytotischen Rezeptors und einer extrazellulären Avidindomäne bestehen. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von Biotin, die eine Kopplung an Chemotherapeutika, Radionuklide oder Zytokine zulassen sowie dessen außergewöhnlich hohen Affinität zu Avidin, könnten die Fusionsproteine im Rahmen gentherapeutischer Anwendungen von klinischem Nutzen sein. Um Lodavin oder Scavidin für die Diagnostik bzw. anti-angiogene Therapie maligner Erkrankungen einzusetzen und Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus zu minimieren, sollten diese spezifisch im Tumorendothel exprimiert werden. Aufgrund der starken und transienten endothelspezifischen Induktion der Flk-1 Expression während der Tumorangiogenese sind regulatorische Elemente des *flk-1* Gens für diesen Zweck besonders geeignet und wurden in der vorliegenden Arbeit für die Expression der Fusionsproteine in transgenen Mäusen verwendet. Die Analyse der Flk-1-Lodavin und Flk-1-Scavidin transgenen Tiere zeigte eine spezifische endotheliale Expression beider Fusionsproteine in allen embryonalen Organsystemen, außer der Lunge Flk-1-Lodavin transgener Embryonen. Die Expression führte zu keinen phänotypischen Veränderungen während der Embryonalentwicklung. In adulten Tieren war keine Expression der Transgene zu beobachten. Einzige Ausnahme waren Gefäße der Milz Flk-1-Lodavin transgener Mäuse. Die Analyse experimenteller BFS-1 Fibrosarkome zeigte, dass beide Fusionsproteine während der Neovaskularisierung der Tumoren exprimiert wurden. Damit wurden erstmals genregulatorische Elemente von *flk-1* für die spezifische Expression von Genen genutzt, die von therapeutischem oder diagnostischem Nutzen sein können. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der retrovirale Gentransfer mittels Co-Injektion von BFS-1 Fibrosarkomen mit GP+E86 Zellen zur selektiven Infektion einsprossender Gefäße des Tumorstromas nicht aber der Tumorzellen führte. Somit wurde ein zweites *in vivo* Modell zur endothelzellspezifischen Expression von Lodavin etabliert. In einem tumorzellspezifischen Modell konnte eine induzierbare Expression von Scavidin in Fibrosarkomen gezeigt werden. Da es derzeit nicht möglich ist, biotinylierte Therapeutika oder Diagnostika kommerziell zu erhalten, wurden erste Bindungsstudien mit Modellliganden durchgeführt und bestätigten die Funktionalität des Lodavin-Systems *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation eines biotinylierten Liganden zur spezifischen Akkumulierung im Lodavin-

exprimierenden Zielgewebe führte. Um das Lodavin/Scavidin-System als gentherapeutisches 2-Schritt Modell für die Diagnostik oder für anti-angiogene Therapien von Tumoren zu etablieren, sollen in zukünftigen Arbeiten geeignete biotinylierte Konjugate mittels der vorgestellten *in vivo* Modelle systematisch ausgetestet werden.

Die Neovaskularisierung von Tumoren bedarf einer fein regulierten transkriptionellen Kontrolle der an der Angiogenese beteiligten Gene. Hierbei spielt u.a. der Transkriptionsfaktor Ets-1 eine entscheidende Rolle, dessen transiente Expression mit der Aktivierung von Endothelzellen assoziiert ist. Untersuchungen an Modellen der physiologischen Angiogenese zeigten einen positiven Einfluss dieses Faktors auf eine Vielzahl endothelzellspezifischer Promotoren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit durch Überexpression der Deletionsmutante dnEts-1 untersucht, ob die Blockierung Ets-1-abhängiger Signalwege für eine Hemmung der Tumorangiogenese ausreicht und Einfluss auf das Tumorstadium nehmen kann. Die dominant-negative Wirkung der Mutante konnte *in vitro* durch Inhibierung des Ets-responsiven *flk-1* Promotors bestätigt werden. Der retrovirale Gentransfer von dnEts-1 wurde am Co-Injektionsmodell von B16 Melanomen sowie am endothelzellspezifischen Modell von BFS-1 Fibrosarkomen durchgeführt. In beiden Tumormodellen konnten trotz Hemmung der Flk-1 Expression jedoch keine Veränderungen der Tumorangiogenese oder der Tumorstadium bestätigt werden. Da Ets-1 ein Faktor in einem Komplex vieler Transkriptionsfaktoren ist, die die Expression an der Tumorangiogenese beteiligter Gene regulieren, sollen in zukünftigen Arbeiten zusätzliche Signalwege blockiert werden. So zielen Untersuchungen auf die Hemmung Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIF). Durch die endothelzellspezifische Expression von HIF2 α gilt dieser als essentieller intrinsischer Faktor bei der Regulation der Hypoxieantwort im Endothel, wie sie im schnell proliferierenden Tumorgewebe auftritt. Darüber hinaus konnte ein positiver Einfluss dieses Transkriptionsfaktors auf eine Vielzahl an der Angiogenese beteiligter Promotoren demonstriert und eine synergistische Wirkung von HIF2 α mit Ets-1 bei der Stimulierung der *flk-1* Expression gezeigt werden (Elvert et al., 2003; Kappel et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die dominant-negative Wirkung der Deletionsmutante dnHIF2 α durch Hemmung des HIF-responsiven *flk-1* Promotors *in vitro* bereits bestätigt. Mit diesem Konstrukt sollen Retroviren generiert werden, die den Gentransfer zur Blockierung HIF-abhängiger Signalwege *in vivo* vermitteln. Die Auswirkung auf die Vaskularisierung von Tumoren, auch in Co-Expression mit dnEts-1, soll in zukünftigen Studien untersucht und als mögliches anti-angiogenes Modell analysiert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U. (1999). Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn*, 215(1), 12-25.
- Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U. (2001). Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation*, 104(3), 358-364.
- Adam M, Schmidt D, Wardelmann E, Wernert N, Albers P. (2003). Angiogenetic protooncogene *ets-1* induced neovascularization is involved in the metastatic process of testicular germ cell tumors. *Eur Urol*, 44(3), 329-336.
- Akuzawa N, Kurabayashi M, Ohyama Y, Arai M, Nagai R. (2000). Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(2), 377-384.
- Allen TM. (1994). Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci*, 15(7), 215-220.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1(10), 1024-1028.
- Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem*, 264(14), 8222-8229.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-967.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. (1999a). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3), 221-228.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. (1999b). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 18(14), 3964-3972.
- Asahara T, Kalka C, Isner JM. (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther*, 7(6), 451-457.
- Asano M, Yukita A, Matsumoto T, Kondo S, Suzuki H. (1995). Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor121. *Cancer Res*, 55(22), 5296-5301.
- Ashkenas J, Penman M, Vasile E, Acton S, Freeman M, Krieger M. (1993). Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res*, 34(6), 983-1000.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds). 1994. *Current protocols in molecular biology*. Indianapolis: Wiley & Sons, Inc.
- Axworthy DB, Reno JM, Hylarides MD, Mallett RW, Theodore LJ, Gustavson LM, Su F, Hobson LJ, Beaumier PL, Fritzberg AR. (2000). Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1802-1807.

- Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, Ortega E. (1998). Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr*, 67(3), 431-437.
- Baish JW, Jain RK. (2000). Fractals and cancer. *Cancer Res*, 60(14), 3683-3688.
- Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting CN, Walunas TL, Lanier LL, Leiden JM. (1998). The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*, 9(4), 555-563.
- Behrens P, Rothe M, Florin A, Wellmann A, Wernert N. (2001a). Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression. *Int J Mol Med*, 8(2), 149-154.
- Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N. (2001b). The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol*, 194(1), 43-50.
- Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, Rothe M, Florin A, Wernert N. (2003). Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer*, 107(2), 183-188.
- Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res*, 86(2), E29-35.
- Benjamin LE, Keshet E. (1997). Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8761-8766.
- Benouchan M, Do Nascimento F, Sebbah-Louriki M, Salzmann JL, Crepin M, Perret GY, Colombo BM. (2003). Bystander cell killing spreading from endothelial to tumor cells in a three-dimensional multicellular nodule model after *Escherichia coli* nitroreductase gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun*, 311(4), 822-828.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, Nov 27;390(6658):404-7.
- Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJ, Corstens FH. (2003). Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J Nucl Med*, 44(3), 400-411.
- Bolon I, Gouyer V, Devouassoux M, Vandenbunder B, Wernert N, Moro D, Brambilla C, Brambilla E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol*, 147(5), 1298-1310.
- Bolon I, Brambilla E, Vandenbunder B, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla C. (1996). Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. *Lab Invest*, 75(1), 1-13.
- Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. (2000). Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem*, 275(51), 39867-39873.
- Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramaraio P, Ferrara N. (1998). Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate*, 35(1), 1-10.

- Bories JC, Willerford DM, Grevin D, Davidson L, Camus A, Martin P, Stehelin D, Alt FW. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature*, 377(6550), 635-638.
- Bottinger EP, Shelley CS, Farokhzad OC, Arnaout MA. (1994). The human beta 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol Cell Biol*, 14(4), 2604-2615.
- Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. (2001). Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol*, 11(11), S32-36.
- Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 87(2), 630-641. *Blood*, 26(5):553-9
- Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W, Reichmann E (2002). Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2002 Jan 10;97(2):142-8.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*, 56(5), 941-943.
- Brown JM. (2000). Tumor radiosensitivity: it's the subpopulations that count. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47(3), 549-550.
- Brown MS, Goldstein JL. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34-47.
- Burri PH, Tarek MR. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*, 228(1), 35-45.
- Cao Y. (2001) Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*, Apr;33(4):357-69.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 5(5), 495-502.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 7(5), 575-583.
- Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest*, 98(4), 886-893.
- Chauhan J, Dakshinamurti K. (1988). Role of human serum biotinidase as biotin-binding protein. *Biochem J*, 256(1), 265-270.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, 19(3), 547-559.

- Chen-Konak L, Guetta-Shubin Y, Yahav H, Shay-Salit A, Zilberman M, Binah O, Resnick N. (2003). Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells. *Faseb J*, 17(14), 2121-2123.
- Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. (1999). Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J Cell Sci*, 112 (Pt 8), 1203-1212.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125(4), 725-732.
- Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development*, 129(23), 5511-5520.
- Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Damiano V, Troiani T, Melisi D, De Vita F, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. (2004). Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res*, 10(2), 784-793.
- Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. (2002). Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8(7), 702-710.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84(5), 1470-1478.
- Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. (1999). EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem*, 274(47), 33709-33713.
- Cormier F, de Paz P, Dieterlen-Lievre F. (1986). In vitro detection of cells with monocytic potentiality in the wall of the chick embryo aorta. *Dev Biol*, 118(1), 167-175.
- Cowan MJ, Wara DW, Packman S, Ammann AJ, Yoshino M, Sweetman L, Nyhan W. (1979). Multiple biotin-dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity. *Lancet*, 2(8134), 115-118.
- Cowley DO, Graves BJ. (2000). Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev*, 14(3), 366-376.
- Crippa F, Bolis G, Seregini E, Gavoni N, Scarfone G, Ferraris C, Buraggi GL, Bombardieri E. (1995). Single-dose intraperitoneal radioimmunotherapy with the murine monoclonal antibody I-131 MOv18: clinical results in patients with minimal residual disease of ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 31A(5), 686-690.
- Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zemleni J. (2004). Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr*, 43(1), 23-31.
- Cronin CA, Gluba W, Scrable H. (2001). The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev*, 15(12), 1506-1517.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 28(9), 488-494.

- Davidson B, Reich R, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Berner A, Ben-Baruch G, Bryne M, Nesland JM. (2001). Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7(3), 551-557.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87(7), 1161-1169.
- de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL. (1998). The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene*, 16(16), 2065-2073.
- De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 9(6), 789-795.
- de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. (2000). Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(2), 290-297.
- Denekamp J. (1993). Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol*, Mar;66(783):181-96.
- Dela Cruz JS, Trinh KR, Morrison SL, Penichet ML. (2000). Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity. *J Immunol*, 165(9), 5112-5121.
- Delannoy-Courdent A, Mattot V, Fafeur V, Fauquette W, Pollet I, Calmels T, Vercamer C, Boilly B, Vandenbunder B, Desbiens X. (1998). The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11), 1521-1534.
- Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*, 14(11), 1568-1573.
- Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP. (1997). Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*, 108(3), 263-268.
- Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP. (1996). Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *Embo J*, 15(1), 125-134.
- Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. (1992). Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 267(2), 1279-1285.
- Dube A, Akbarali Y, Sato TN, Libermann TA, Oettgen P. (1999). Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res*, 84(10), 1177-1185.
- Dube A, Thai S, Gaspar J, Rudders S, Libermann TA, Iruela-Arispe L, Oettgen P. (2001). Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development. *Circ Res*, 88(2), 237-244.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*, 8(16), 1897-1909.
- Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular

- endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*, 203(1), 80-92.
- Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282(5390), 946-949.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237, 97-132.
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, Mar 1;60(5):1388-93.
- Eichmann A, Corbel C, Jaffredo T, Breant C, Joukov V, Kumar V, Alitalo K, le Douarin NM. (1998). Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development*, 125(4), 743-752.
- Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D. (2002). Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(2), 207-214.
- Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*, 278(9), 7520-7530.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4273-4278.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1853-1865.
- Fadel BM, Boutet SC, Quertermous T. (1999). Octamer-dependent in vivo expression of the endothelial cell-specific TIE2 gene. *J Biol Chem*, 274(29), 20376-20383.
- Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J. (1999). Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(3), 891-894.
- Fedorov LM, Tyrsin OY, Krenn V, Chernigovskaya EV, Rapp UR. (2001). Tet-system for the regulation of gene expression during embryonic development. *Transgenic Res*, 10(3), 247-258.
- Ferrara N, Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161(2), 851-858.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573), 439-442.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HJ, Novotny W. (2004). Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Rev Drug Discov*, May;3(5):391-400.

- Flamme I, Frolich T, Risau W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*, 173(2), 206-210.
- Folkman J. (1997). Addressing tumor blood vessels. *Nat Biotechnol*, 15(6), 510.
- Folkman J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66-70.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, 126(13), 3015-3025.
- Freundlieb S, Schirra-Muller C, Bujard H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med*, 1(1), 4-12.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*, 270(5241), 1500-1502.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*, 94(6), 715-725.
- Gabizon A, Papahadjopoulos D. (1992). The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1103(1), 94-100.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, et al (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3:411-423.
- Gallagher AR, Schonig K, Brown N, Bujard H, Witzgall R. (2003). Use of the tetracycline system for inducible protein synthesis in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 14(8), 2042-2051.
- Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, Rosnet O, Birnbaum D. (1993). The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene*, 8(5), 1233-1240.
- Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D. (1993). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors*, 8(2), 109-117.
- Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A. (1997). Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology*, 54(3), 177-184.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272(38), 23659-23667.
- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126(6), 1149-1159.
- Ghersa P, Gobert RP, Sattonnet-Roche P, Richards CA, Merlo Pich E, Hooft van Huijsduijnen R. (1998). Highly controlled gene expression using combinations of a tissue-specific promoter, recombinant adenovirus and a tetracycline-regulatable transcription factor. *Gene Ther*, 5(9), 1213-1220.
- Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levensgood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. (2000).

- Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*, 25(1), 29-41.
- Gluzman Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1), 175-182.
- Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH, Vince GH, Roosen K, Tonn JC. (1999). Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *J Neurosci Res*, 55(4), 486-495.
- Goldstein JL, Brown MS. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 46, 897-930.
- Gorski DH, Walsh K. (2000). The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. *Circ Res*, 87(10), 865-872.
- Gory S, Dalmon J, Prandini MH, Kortulewski T, de Launoit Y, Huber P. (1998). Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem*, 273(12), 6750-6755.
- Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. (1999). The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, 93(1), 184-192.
- Gossen M, Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766-1769.
- Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 277(26), 23508-23514.
- Grana C, Chinol M, Robertson C, Mazzetta C, Bartolomei M, De Cicco C, Fiorenza M, Gatti M, Caliceti P, Paganelli G. (2002). Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study. *Br J Cancer*, 86(2), 207-212.
- Green NM. (1975). Avidin. *Adv Protein Chem*, 29, 85-133.
- Grevin D, Chen JH, Raes MB, Stehelin D, Vandenbunder B, Desbiens X. (1993). Involvement of the proto-oncogene c-ets 1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation. *Int J Dev Biol*, 37(4), 519-529.
- Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, Boyd D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem*, 271(18), 10672-10680.
- Hafner M, Orosz P, Kruger A, Mannel DN. (1996). TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity. *Int J Cancer*, 66(3), 388-392.
- Hagman J, Grosschedl R. (1992). An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19), 8889-8893.
- Hanahan D, Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Harats D, Kurihara H, Belloni P, Oakley H, Ziober A, Ackley D, Cain G, Kurihara Y, Lawn R, Sigal E. (1995). Targeting gene expression to the vascular wall in transgenic mice using the murine preproendothelin-1 promoter. *J Clin Invest*, 95(3), 1335-1344.

- Hasegawa Y, Abe M, Yamazaki T, Niizeki O, Shiiba K, Sasaki I, Sato Y. (2004). Transcriptional regulation of human angiopoietin-2 by transcription factor Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 316(1), 52-58.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, 156(4), 1363-1380.
- He Z, Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*, 90(4), 739-751.
- Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marme D, Augustin HG, Fiedler U. (2004). Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct;24(10):1803-9. Epub 2004 Jul 29.
- Heidenreich R, Kappel A, Breier G. (2000). Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences. *Cancer Res*, 60(21), 6142-6147.
- Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, Hilbig A, Wild C, Clauss M, Plate KH, Breier G. (2004). Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants. *Int J Cancer*, 111(3), 348-357.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*, 3(2), 177-182.
- Hirai H, Ogawa M, Suzuki N, Yamamoto M, Breier G, Mazda O, Imanishi J, Nishikawa S. (2003). Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis. *Blood*, 101(3), 886-893.
- Ho DY, McLaughlin JR, Sapolsky RM. (1996). Inducible gene expression from defective herpes simplex virus vectors using the tetracycline-responsive promoter system. *Brain Res Mol Brain Res*, 41(1-2), 200-209.
- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4607-4612.
- Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*, 56(19), 4509-4515.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. (1999a). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284(5422), 1994-1998.
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. (1999b). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38), 5356-5362.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. (2002). Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 296(5577), 2404-2407.
- Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y. (1991). Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res*, 51(22), 6180-6184.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, 271(50), 32253-32259.

- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, Jun 3;350(23):2335-42.
- Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. (1997). Biotinidase in serum and tissues. *Methods Enzymol*, 279, 422-434.
- Iida A, Chen ST, Friedmann T, Yee JK. (1996). Inducible gene expression by retrovirus-mediated transfer of a modified tetracycline-regulated system. *J Virol*, 70(9), 6054-6059.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. (1995). Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*, 270(34), 19761-19766.
- Iljin K, Dube A, Kontusaari S, Korhonen J, Lahtinen I, Oettgen P, Alitalo K. (1999). Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J*, 13(2), 377-386.
- Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC, Gaetano C. (2000). Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res*, 86(12), E110-117.
- Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttrop N, Clauss M. (2003). p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *Faseb J*, 17(2), 262-264.
- Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. (1996). Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 169(3), 522-531.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, 12(2), 149-162.
- Jahroudi N, Lynch DC. (1994). Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol Cell Biol*, 14(2), 999-1008.
- Jain RA, Rhodes CT, Railkar AM, Malick AW, Shah NH. (2000). Controlled delivery of drugs from a novel injectable in situ formed biodegradable PLGA microsphere system. *J Microencapsul*, 17(3), 343-362.
- Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev*, 73(1), 117-123.
- Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, 4(5), 549-553.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276(5317), 1423-1425.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5), 709-720.
- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 257-267.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a

- ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, 15(7), 1751.
- Jussila L, Alitalo K. (2002). Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 82(3), 673-700.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. (1995). Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3566-3570.
- Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood*, 83(5), 1200-1208.
- Kalofonos HP, Rusckowski M, Siebecker DA, Sivolapenko GB, Snook D, Lavender JP, Epenetos AA, Hnatowich DJ. (1990). Imaging of tumor in patients with indium-111-labeled biotin and streptavidin-conjugated antibodies: preliminary communication. *J Nucl Med*, 31(11), 1791-1796.
- Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G. (1999). Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood*, 93(12), 4284-4292.
- Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G. (2000). Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of *flk-1* expression during murine vascular development. *Blood*, 96(9), 3078-3085.
- Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. (2001). A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12677-12682.
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, Jan;5(1):74-80.
- Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Tsuchida K, Kodama H, Kunisada T, Risau W, Kita T, Nishikawa SI. (1997). Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ*, 39(6), 729-740.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126(21), 4895-4902.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246(4935), 1309-1312.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*, 93(11), 1074-1081.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(2), 189-204.
- Khatun S, Fujimoto J, Toyoki H, Tamaya T. (2003). Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers. *Cancer Sci*, 94(9), 769-773.

- Kim IS, Kim SH. (2003). Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety. *Int J Pharm*, 257(1-2), 195-203.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362(6423), 841-844.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*, 121(12), 4309-4318.
- Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):R15-24.
- Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. (1998). Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol*, 8(9), 529-532.
- Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Dumont D, Alitalo K. (1995). Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood*, 86(5), 1828-1835.
- Kornegay ET, van Heugten PH, Lindemann MD, Blodgett DJ. (1989). Effects of biotin and high copper levels on performance and immune response of weanling pigs. *J Anim Sci*, 67(6), 1471-1477.
- Kou B, Li Y, Zhang L, Zhu G, Wang X, Xia J, Shi Y. (2004). In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp Mol Pathol*, 76(2), 129-137.
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O. (1997). ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol*, 191(2), 297-305.
- Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res*. Jan 1;61(1):39-44.
- Krieger M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*, 8(5), 275-280.
- Kroll J, Waltenberger J. (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 272(51), 32521-32527.
- Kubo H, Alitalo K. (2003). The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev*, 17(3), 322-329.
- Kumar CC. (2003). Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets*, Feb;4(2):123-31.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, 16(12), 1466-1471.
- Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. (2000). Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res*. Oct 1;60(19):5565-70.
- Lehtolainen P, Taskinen A, Laukkanen J, Airene KJ, Heino S, Lappalainen M, Ojala K, Marjomaki V, Martin JF, Kulomaa MS, Yla-Herttuala S. (2002). Cloning and

- characterization of Scavidin, a fusion protein for the targeted delivery of biotinylated molecules. *J Biol Chem*, 277(10), 8545-8550.
- Lehtolainen P, Wirth T, Taskinen AK, Lehenkari P, Leppanen O, Lappalainen M, Pulkkanen K, Marttila A, Marjomaki V, Airenne KJ, Horton M, Kulomaa MS, Yla-Herttuala S. (2003). Targeting of biotinylated compounds to its target tissue using a low-density lipoprotein receptor-avidin fusion protein. *Gene Ther*, 10(25), 2090-2097.
- Lelievre E, Mattot V, Huber P, Vandenbunder B, Soncin F. (2000). ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene*, 19(20), 2438-2446.
- Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. (2001). The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(4), 391-407.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306-1309.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 273(11), 6417-6423.
- Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, Pease J, Choi HS, Doede T, Chu P, Ning S, Lee DY, Bednarski MD, Knox SJ. (2004). A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(4), 1215-1227.
- Licht AH, Raab S, Hofmann U, Breier G. (2004). Endothelium-specific Cre recombinase activity in flk-1-Cre transgenic mice. *Dev Dyn*, 229(2), 312-318.
- Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC, van Empel LJ, Boot MJ, Kerkdijk H, de Kant E, DeRuiter MC. (2003). Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. *Circ Res*, 92(7), 749-756.
- Lim F, Kraut N, Framptom J, Graf T. (1992). DNA binding by c-Ets-1, but not v-Ets, is repressed by an intramolecular mechanism. *Embo J*, 11(2), 643-652.
- Limat A, Suormala T, Hunziker T, Waelti ER, Braathen LR, Baumgartner R. (1996). Proliferation and differentiation of cultured human follicular keratinocytes are not influenced by biotin. *Arch Dermatol Res*, 288(1), 31-38.
- Lin P, Sankar S, Shan S, Dewhirst MW, Polverini PJ, Quinn TQ, Peters KG. (1998). Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ*, 9(1), 49-58.
- Lionneton F, Lelievre E, Baillat D, Stehelin D, Soncin F. (2003). Characterization and functional analysis of the p42Ets-1 variant of the mouse Ets-1 transcription factor. *Oncogene*, 22(57), 9156-9164.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77(3), 638-643.
- Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. (2002). Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*, 12(2), 88-96.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 7(11), 1194-1201.

- Machein MR, Risau W, Plate KH. (1999). Antiangiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor 2. *Hum Gene Ther*, 10(7), 1117-1128.
- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R. (2000) Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, Jul 14;275(28):21340-8.
- Magnani P, Fazio F, Grana C, Songini C, Frigerio L, Pecorelli S, Mangili G, Colombo N, Mariani CD, Paganelli G. (2000). Diagnosis of persistent ovarian carcinoma with three-step immunoscintigraphy. *Br J Cancer*, 82(3), 616-620.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322), 55-60.
- Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K. (1999). Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem*. Jul 23;274(30):21217-22.
- Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, Alitalo K. (2001). Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*, 7(2), 199-205.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), 550-554.
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem*, 277(36), 32405-32408.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386(6623), 403-407.
- Markowitz D, Goff S, Bank A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol*, 62(4), 1120-1124.
- Maroulakou IG, Bowe DB. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, 19(55), 6432-6442.
- Marron MB, Hughes DP, Edge MD, Forder CL, Brindle NP. (2000). Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2. *J Biol Chem*, 275(50), 39741-39746.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 2001(112), RE21.
- Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P, Claesson-Welsh L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol*, 156(1), 149-160.
- Mattot V, Vercamer C, Soncin F, Calmels T, Huguet C, Fafeur V, Vandenbunder B. (2000). Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene*, 19(6), 762-772.
- Maquoi E, Sounni NE, Devy L, Olivier F, Franken F, Krell HW, Grams F, Foidart JM, Noel A. (2004). Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin Cancer Res*, Jun 15;10(12 Pt 1):4038-47.

- Mendel DB, Schreck RE, West DC, Li G, Strawn LM, Tanciongco SS, Vasile S, Shawver LK, Cherrington JM. (2000). The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clin Cancer Res*, 6(12), 4848-4858.
- Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*, 273(35), 22272-22278.
- Mignatti P, Rifkin DB. (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*, 49(1-3), 117-137.
- Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72(6), 835-846.
- Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*, 367(6463), 576-579.
- Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res*, 56(7), 1615-1620.
- Minami T, Kuivenhoven JA, Evans V, Kodama T, Rosenberg RD, Aird WC. (2003). Ets motifs are necessary for endothelial cell-specific expression of a 723-bp Tie-2 promoter/enhancer in Hprt targeted transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(11), 2041-2047.
- Mock DM, Malik MI. (1992). Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein. *Am J Clin Nutr*, 56(2), 427-432.
- Moghim SM, Hunter AC, Murray JC. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53(2), 283-318.
- Morishita K, Johnson DE, Williams LT. (1995). A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem*, 270(46), 27948-27953.
- Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Udono T, Tomita K, Tamai M, Sogawa K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. (2003). HLF/HIF-2 α is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *Embo J*, 22(5), 1134-1146.
- Moss J, Lane MD. (1971). The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 35, 321-442.
- Mustonen T, Alitalo K. (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*, 129(4), 895-898.
- Muthusamy N, Barton K, Leiden JM. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature*, 377(6550), 639-642.
- Na K, Lee ES, Bae YH. (2003). Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J Control Release*, 87(1-3), 3-13.
- Nakano T, Abe M, Tanaka K, Shineha R, Satomi S, Sato Y. (2000). Angiogenesis inhibition by transdominant mutant Ets-1. *J Cell Physiol*, 184(2), 255-262.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, 13(1), 9-22.
- Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol*, 515, 81-90.

- Oda N, Abe M, Sato Y. (1999). ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol*, 178(2), 121-132.
- Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, Sato Y. (2001). Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(1), 39-43.
- Olah I, Medgyes J, Glick B. (1988). Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo. *Anat Rec*, 222(1), 60-68.
- Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. (1996). Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem*, 271(32), 19310-19317.
- Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11709-11714.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, Oct 21;79(2):315-28.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, Jan 24;88(2):277-85.
- Paganelli G, Magnani P, Zito F, Villa E, Sudati F, Lopalco L, Rossetti C, Malcovati M, Chiolerio F, Seccamani E. (1991). Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res*. 1991 Nov 1;51(21):5960-6.
- Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, De Cicco C, De Braud F, Robertson C, Zurrida S, Casadio C, Zoboli S, Siccaldi AG, Veronesi U. (1999). Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med*, 26(4), 348-357.
- Paganelli G, Bartolomei M, Ferrari M, Cremonesi M, Broggi G, Maira G, Sturiale C, Grana C, Prisco G, Gatti M, Caliceti P, Chinol M. (2001). Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother Radiopharm*, 16(3), 227-235.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300(5893), 611-615.
- Panyam J, Labhasetwar V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(3), 329-347.
- Pardanaud L, Altmann C, Kito P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100(2), 339-349.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development*, 105(3), 473-485.

- Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F. (1993). Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhes Commun*, 1(2), 151-160.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development*, 122(5), 1363-1371.
- Partanen J, Puri MC, Schwartz L, Fischer KD, Bernstein A, Rossant J. (1996). Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase TIE in a late phase of angiogenic capillary growth and endothelial cell survival during murine development. *Development*, 122(10), 3013-3021.
- Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *Faseb J*, 14(13), 2087-2096.
- Patan S, Alvarez MJ, Schittny JC, Burri PH. (1992). Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Arch Histol Cytol*, 55 Suppl, 65-75.
- Patan S, Haenni B, Burri PH. (1996a). Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res*, 51(1), 80-98.
- Patan S, Munn LL, Jain RK. (1996b). Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 51(2), 260-272.
- Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, Agrawal A, Blanchard KS, Grimm SL, Jensen KL, Andrews LE, Wincott FE, Pitot PA, Tressler RJ, Cushman C, Reynolds MA, Parry TJ. (2000). Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res*, 6(5), 2094-2103.
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. (2000). The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15), 8386-8391.
- Peng LS, Penichet ML, Dela Cruz JS, Sampogna SL, Morrison SL. (2001). Mechanism of antitumor activity of a single-chain interleukin-12 IgG3 antibody fusion protein (mscIL-12.her2.IgG3). *J Interferon Cytokine Res*, 21(9), 709-720.
- Penman M, Lux A, Freedman NJ, Rohrer L, Ekkel Y, McKinstry H, Resnick D, Krieger M. (1991). The type I and type II bovine scavenger receptors expressed in Chinese hamster ovary cells are trimeric proteins with collagenous triple helical domains comprising noncovalently associated monomers and Cys83-disulfide-linked dimers. *J Biol Chem*, 266(35), 23985-23993.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 181(2), 902-906.
- Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol*, 177(3), 439-452.
- Petrelli F, Marsili G, Santarelli I. (1974). Genesis of leukocytosis in biotin deficiency. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 50(14), 1095-1101.
- Petrelli F, Moretti P, Campanati G. (1981). Studies on the relationships between biotin and behaviour of B and T lymphocytes in the guinea-pig. *Experientia*, 37(11), 1204-1206.

- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. (1999). Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*, 253(1), 117-130.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359(6398), 845-848.
- Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. (1993). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 53(23), 5822-5827.
- Platt N, da Silva RP, Gordon S. (1999). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett*, 65(1-2), 15-19.
- Pourtier-Manzanedo A, Vercamer C, Van Belle E, Mattot V, Mouquet F, Vandenbunder B. (2003). Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene*, 22(12), 1795-1806.
- Procopio WN, Pelavin PI, Lee WM, Yeilding NM. (1999). Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J Biol Chem*, 274(42), 30196-30201.
- Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. (1995). The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *Embo J*, 14(23), 5884-5891.
- Puri MC, Partanen J, Rossant J, Bernstein A. (1999). Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development*, 126(20), 4569-4580.
- Puri MC, Bernstein A. (2003). Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), 12753-12758.
- Queva C, Leprince D, Stehelin D, Vandenbunder B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene*, 8(9), 2511-2520.
- Raab S, Beck H, Gaumann A, Yuce A, Gerber HP, Plate K, Hammes HP, Ferrara N, Breier G. (2004). Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost*, 91(3), 595-605.
- Rabault B, Ghysdael J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem*, 269(45), 28143-28151.
- Rabin BS. (1983). Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr*, 113(11), 2316-2322.
- Raffi S. (2000). Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*, 105(1), 17-19.
- Rahimi N, Kazlauskas A. (1999). A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 10(10), 3401-3407.
- Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. (2000). Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 275(22), 16986-16992.
- Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM. (2003). Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res*, May 1;63(9):2079-87.
- Rendahl KG, Quiroz D, Ladner M, Coyne M, Seltzer J, Manning WC, Escobedo JA. (2002). Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-

- inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, 13(2), 335-342.
- Reynolds AR, Moein Moghimi S, Hodivala-Dilke K. (2003). Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med*, 9(1), 2-4.
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 274(46), 32631-32637.
- Risau W, Flamme I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 73-91.
- Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674.
- Rodewald HR, Sato TN. (1996). Tie1, a receptor tyrosine kinase essential for vascular endothelial cell integrity, is not critical for the development of hematopoietic cells. *Oncogene*, 12(2), 397-404.
- Rodriguez-Melendez R, Zemleni J. (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem*, 14(12), 680-690.
- Rofstad EK. (2000). Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol*, 76(5), 589-605.
- Ronicke V, Risau W, Breier G. (1996). Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res*, 79(2), 277-285.
- Rosano C, Arosio P, Bolognesi M. (1999). The X-ray three-dimensional structure of avidin. *Biomol Eng*, 16(1-4), 5-12.
- Rosebrough SF. (1993). Pharmacokinetics and biodistribution of radiolabeled avidin, streptavidin and biotin. *Nucl Med Biol*, 20(5), 663-668.
- Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Wernert N, Bosserhoff AK. (2004). The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*, 61(1), 118-128.
- Rudek MA, Venitz J, Figg WD. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy*, Jun;22(6):705-20.
- Ruegg C, Dormond O, Foletti A. (2002) Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium*;9(3):151-60.
- Ruggeri B, Singh J, Gingrich D, Angeles T, Albom M, Yang S, Chang H, Robinson C, Hunter K, Dobrzanski P, Jones-Bolin S, Pritchard S, Aimone L, Klein-Szanto A, Herbert JM, Bono F, Schaeffer P, Casellas P, Bourie B, Pili R, Isaacs J, Ator M, Hudkins R, Vaught J, Mallamo J, Dionne C. (2003). CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res*, 63(18), 5978-5991.
- Rusckowski M, Fogarasi M, Fritz B, Hnatowich DJ. (1997). Effect of endogenous biotin on the applications of streptavidin and biotin in mice. *Nucl Med Biol*, 24(3), 263-268.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J*, 17(11), 3005-3015.
- Sabatino G, Chinol M, Paganelli G, Papi S, Chelli M, Leone G, Papini AM, De Luca A, Ginanneschi M. (2003). A new biotin derivative-DOTA conjugate as a candidate for pretargeted diagnosis and therapy of tumors. *J Med Chem*, 46(14), 3170-3173.
- Saez E, No D, West A, Evans RM. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol*, 8(5), 608-616.

- Saez E, Nelson MC, Eshelman B, Banayo E, Koder A, Cho GJ, Evans RM. (2000). Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14512-14517.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain -terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, 376(6535), 70-74.
- Sato Y. (1998). Transcription factor ETS-1 as a molecular target for angiogenesis inhibition. *Hum Cell*, 11(4), 207-214.
- Sato Y. (2001). Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 26(1), 19-24.
- Schechter B, Silberman R, Arnon R, Wilchek M. (1990). Tissue distribution of avidin and streptavidin injected to mice. Effect of avidin carbohydrate, streptavidin truncation and exogenous biotin. *Eur J Biochem*, 189(2), 327-331.
- Scheerger SB, Zempleni J. (2003). Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res*, 73(6), 461-467.
- Schlaeger TM, Qin Y, Fujiwara Y, Magram J, Sato TN. (1995). Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development*, 121(4), 1089-1098.
- Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3058-3063.
- Schonig K, Schwenk F, Rajewsky K, Bujard H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res*, 30(23), e134.
- Semenza GL, Agani F, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Leung S, Yu A. (1999). Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci*, 874, 262-268.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983-985.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66.
- Sharkey RM, Karacay H, Griffiths GL, Behr TM, Blumenthal RD, Mattes MJ, Hansen HJ, Goldenberg DM. (1997). Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconj Chem*, 8(4), 595-604.
- Sharrocks AD. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11), 827-837.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845.

- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. (1993). Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest*, 91(5), 2235-2243.
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3), 768-772.
- Sieweke MH, Tekotte H, Jarosch U, Graf T. (1998). Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo J*, 17(6), 1728-1739.
- Skalicky JJ, Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP. (1996). Structural coupling of the inhibitory regions flanking the ETS domain of murine Ets-1. *Protein Sci*, 5(2), 296-309.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735-745.
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem*, 85(2), 357-368.
- Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. (1999). Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J*, 18(4), 882-892.
- Solorzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A. (2002). Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5325-5330.
- Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J. (2001). Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem*, 268(20), 5424-5429.
- Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol*, 18(6), 3112-3119.
- Stella M, De Nardi P, Paganelli G, Magnani P, Mangili F, Sassi I, Baratti D, Gini P, Zito F, Cristallo M, et al. (1994). Avidin-biotin system in radioimmunoguided surgery for colorectal cancer. Advantages and limits. *Dis Colon Rectum*, 37(4), 335-343.
- Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. (2003). Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; Apr 15;100(8):4766-71.
- Sun J, Blaskovich MA, Jain RK, Delarue F, Paris D, Brem S, Wotoczek-Obadia M, Lin Q, Coppola D, Choi K, Mullan M, Hamilton AD, Sefti SM. (2004). Blocking angiogenesis and tumorigenesis with GFA-116, a synthetic molecule that inhibits binding of vascular endothelial growth factor to its receptor. *Cancer Res*, 64(10), 3586-3592.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7), 1171-1180.
- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. (1998). Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282(5388), 468-471.
- Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Kedar D, Mian B, Huang S, Baker C, Fan Z, Hicklin DJ, Pettaway CA, Dinney CP. (2002). Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate

- cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res*, 8(8), 2714-2724.
- Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M. (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6), 3657-3662.
- Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. (2004). Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res*, Jul 23;95(2):146-53.
- Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. (2004). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*, 64(10), 3365-3370.
- Teng PI, Dichiaro MR, Komuves LG, Abe K, Quertermous T, Topper JN. (2002). Inducible and selective transgene expression in murine vascular endothelium. *Physiol Genomics*, 11(2), 99-107.
- Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJ. (2000). Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(8), 1860-1872.
- Teruyama K, Abe M, Nakano T, Takahashi S, Yamada S, Sato Y. (2001). Neurophilin-1 is a downstream target of transcription factor Ets-1 in human umbilical vein endothelial cells *FEBS Lett*, Aug 24;504(1-2):1-4
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 286(5449), 2511-2514.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11(1), 72-82.
- Tomita N, Morishita R, Taniyama Y, Koike H, Aoki M, Shimizu H, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. (2003). Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1. *Circulation*, 107(10), 1411-1417.
- Tsai SY, O'Malley BW, DeMayo FJ, Wang Y, Chua SS. (1998). A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Adv Drug Deliv Rev*, 30(1-3), 23-31.
- Tseng JF, Farnebo FA, Kisker O, Becker CM, Kuo CJ, Folkman J, Mulligan RC. (2002). Adenovirus-mediated delivery of a soluble form of the VEGF receptor Flk1 delays the growth of murine and human pancreatic adenocarcinoma in mice. *Surgery*, 132(5), 857-865.
- Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. (2002). Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest*, 109(6), 777-785.
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonnier PC, Davis S, Yancopoulos GD. (1999). Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 1904-1909.
- Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, Wernert N. (1999). Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is

- associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res*, 59(21), 5608-5614.
- van Gog FB, Visser GW, Gowrising RW, Snow GB, van Dongen GA. (1998). Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc/⁹⁹Tc-MAG3-biotin conjugates for antibody pretargeting strategies. *Nucl Med Biol*, 25(7), 611-619.
- Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development*, 107(2), 265-274.
- Vandenbunder B, Queva C, Desbiens X, Wernert N, Stehelin D. (1994). Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis*, 14(1-6), 198-209.
- Varner JA, Brooks PC, Cheresch DA. (1995). REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun*, 3(4), 367-374.
- Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A. (1994). Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol*, Apr;63(2):247-54.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, 60(2), 203-212.
- Vidal F, Aragonés J, Alfranca A, de Landazuri MO. (2000). Up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1. *Blood*, 95(11), 3387-3395.
- Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6273-6278.
- Wakiya K, Begue A, Stehelin D, Shibuya M. (1996). A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem*, 271(48), 30823-30828.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269(43), 26988-26995.
- Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. (1996). Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*, 94(7), 1647-1654.
- Walunas TL, Wang B, Wang CR, Leiden JM. (2000). Cutting edge: the Ets1 transcription factor is required for the development of NK T cells in mice. *J Immunol*, 164(6), 2857-2860.
- Ward NL, Dumont DJ. (2002). The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol*, 13(1), 19-27.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95(4), 1789-1797.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J*, 10(5), 1127-1134.

- Watanabe D, Takagi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Ohashi H, Kemmochi S, Uemura A, Ojima T, Suganami E, Miyamoto N, Sato Y, Honda Y. (2004). Transcription factor Ets-1 mediates ischemia- and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization. *Am J Pathol*, 164(5), 1827-1835.
- Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandenbunder B, Stehelin D. (1992). c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol*, 140(1), 119-127.
- Wernert N, Stanjek A, Hugel A, Giannis A. (1999). Inhibition of angiogenesis on the chicken chorioallantoic membrane by Ets 1 antisense oligodeoxynucleotides. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 83, 212-215.
- Wernert N, Justen HP, Rothe M, Behrens P, Dreschers S, Neuhaus T, Florin A, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y. (2002). The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Mol Med*, 80(4), 258-266.
- Wilbur DS, Hamlin DK, Pathare PM, Weerawarna SA. (1997). Biotin reagents for antibody pretargeting. Synthesis, radioiodination, and in vitro evaluation of water soluble, biotinidase resistant biotin derivatives. *Bioconjug Chem*, 8(4), 572-584.
- Wilbur DS, Pathare PM, Hamlin DK, Stayton PS, To R, Klumb LA, Buhler KR, Vessella RL. (1999). Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting. *Biomol Eng*, 16(1-4), 113-118.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, 10(2), 145-147.
- Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3071-3076.
- Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. (1997). Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*, 81(4), 567-574.
- Wu Y, Moser M, Bautch VL, Patterson C. (2003). HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5680-5691.
- Xu X, Clarke P, Szalai G, Shively JE, Williams LE, Shyr Y, Shi E, Primus FJ. (2000). Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-interleukin 2 fusion protein. *Cancer Res*, 60(16), 4475-4484.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. (1993). flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 118(2), 489-498.
- Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. (2003). Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*, 93(7), 664-673.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408(6808), 92-96.

- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242-248.
- Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, Kuroiwa Y. (1999). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci*, 64(4), 249-258.
- Yoshida Y, Hamada H. (1997). Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun*, 230(2), 426-430.
- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 129(20), 4797-4806.
- Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M. (1999). In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol*, 159(2), 391-400.
- Zauner W, Farrow NA, Haines AM. (2001). In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release*, 71(1), 39-51.
- Zempleni J, Mock DM. (1998). Uptake and metabolism of biotin by human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol*, 275(2 Pt 1), C382-388.
- Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. (2001). Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*, 276(29), 26969-26979.
- Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE. (2002). A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis*, 5(1-2), 35-44.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, 59(22), 5830-5835.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol*, 13(2), 121-128.

VII. Anhang

VII.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung
Ang	Angiopoietin
APS	Ammoniumpeoxodirsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Av	Avidin
BAEC	bovine Aortenendothelzellen
bp	Basenpaare
bHLH	basisches Helix-Schleife-Helix Motiv
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CS	bovines Kälberserum
CMV	Cytomegalievirus
CRE	zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) responsives Element
CREB	CRE bindendes Protein
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
Dox	Doyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
EBS/ETS	Ets Bindungsstelle
ECM	extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FAK	Fokaladhäsionskinase
FCS	fetales Kälberserum
FIH	HIF-1 inhibierender Faktor
Flk-1	fetale Leberkinase

Flt-1	Fms-ähnliche Tyrosin-Kinase
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phospho-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G418	Neomycin
h	Stunde
HBS	HIF2 Bindungsstelle
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF	Hyopxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hyopxie-responsives Element
HUE	humane Endothelzellen der Nabelschnur
HUVEV	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin ähnlicher Faktor
kDa	Kilodalton
KDR	Rezeptor mit inserierter Kinaseinsedomäne
l	Liter
LDL-R	Rezeptor für Lipoproteine niedriger Dichte
Luz	Luziferase
LB	Luria-Bertani Medium
M	Molar
mA	Miliampere
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NERF-2	neuer nuklärer Ets-ähnlicher Faktor-2
NFκB	nukleärer Faktor κB
NRP	Neuropilin
OD	optische Dichte
ODD	sauerstoffabhängige Zerstörungsdomäne
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-ARNT-Sim Homologie
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p/e	Promotor und Enhancer des <i>flk-1</i> Gens
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3'OH-Kinase
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PNT	<i>pointed domain</i>
PNV	perineuraler vaskulärer Plexus
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
rtTA	reverser Tc-antwortender Transaktivator
pVHL	von Hippel Lindau Protein
rpm	Rotationen pro Minute
sAv	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR-A	Scavenger Rezeptor A
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tc	Tetrazyklin
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TG	Transgen
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
Tie	Tyrosinkinase mit Ig- und EGF Homologie-Domänen
TK	Thymidinkinase

TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminoethan
tTA	Tc-antwortender Transaktivator
tTS	Tc-antwortender Silencer
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VE-Cadherin	Cadherin vaskulärer Endothelzellen
VEGF	vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
vWF	vonWillebrand Faktor
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-inolyl-beta-D-galactopyranosid

VII.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Beato, Clauss, Daut, Eilers, Elsässer, Habermehl, Hartmann, Juncclas, Kern, Kirchner, Knöller, Koch, Koolmann, Lill, Löffler, Lührmann, Müller, Niessing, Röhm, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz J., Seitz K.A., Steinmetz, von Löw, Westermann

VII.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anke Nicolaus, geboren am 09.03.1974 in Offenbach, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Gentherapeutische Modelle zur anti-angiogenen Therapie experimenteller Tumoren“ im Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim, sowie im Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden unter der Leitung von Prof. Georg Breier und Prof. Matthias Clauss ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bzw. werden in Fachartikeln veröffentlicht:

Regina Heidenreich, Marcia Machein, **Anke Nicolaus**, Andreas Hilbig, Carola Wild, Matthias Clauss, Karl H. Plate, Georg Breier

Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants

International Journal of Cancer 111, 348-357, April 2004

Anke Nicolaus, Seppo Ylä-Herttuala, Georg Breier

Endothelial-specific expression of Lodavin and Scavidin in transgenic mice: A model for vascular targeting in diagnosis and therapy of tumors, 2004, *Manuskript in Vorbereitung*

Marburg, den 26.10.2004

Anke Nicolaus